



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PROTEÍNAS ENDOMETRIALES INDUCIDAS POR LA ANTICONCEPCIÓN DE EMERGENCIA QUE MODULAN LA FUNCIÓN ESPERMÁTICA EN HUMANO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

GABRIELA HERNÁNDEZ SILVA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MAYEL DEL VALLE CHIRINOS ESPÍN
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LAURA ELENA DÍAZ CUETO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. LETICIA MORALES LEDESMA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PROTEÍNAS ENDOMETRIALES INDUCIDAS POR LA ANTICONCEPCIÓN DE EMERGENCIA QUE MODULAN LA FUNCIÓN ESPERMÁTICA EN HUMANO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

GABRIELA HERNÁNDEZ SILVA

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MAYEL DEL VALLE CHIRINOS ESPÍN
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. LAURA ELENA DÍAZ CUETO
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DRA. LETICIA MORALES LEDESMA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 01 de septiembre de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **HERNÁNDEZ SILVA GABRIELA** con número de cuenta **406013949**, con la tesis titulada **"PROTEÍNAS ENDOMETRIALES INDUCIDAS POR LA ANTICONCEPCIÓN DE EMERGENCIA QUE MODULAN LA FUNCIÓN ESPERMÁTICA EN HUMANO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MAYEL DEL VALLE CHIRINOS ESPÍN**:

Presidente: DR. ENRIQUE OTHÓN HERNÁNDEZ GONZÁLEZ
Vocal: DRA. ELENA ZAMBRANO GONZÁLEZ
Secretario: DRA. LAURA ELENA DÍAZ CUETO
Suplente: DR. FERNANDO LARREA GALLO
Suplente: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 06 de noviembre de 2014

M. del Coro Arizmendi Arriaga

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por la realización de esta tesis de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para este trabajo de investigación (No. de registro 280482) y por la financiación parcial del mismo por parte del proyecto SEP-2010-C01-154923.

A la Dra. Mayel Chirinos Espín por el tiempo dedicado a la realización de este proyecto y a mi formación profesional.

A la Dra. Laura Elena Díaz Cueto y a la Dra. Leticia Morales Ledesma que fueron parte del comité tutor que supervisó el desarrollo de este trabajo de tesis.

A lo miembros del jurado:

Dra. Laura Díaz Cueto

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dra. Elena Zambrano González

Dr. Enrique Othón Hernández González

Dr. Fernando Larrea Gallo

Por sus aportaciones para el desarrollo de esta tesis.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mis papás

A mi hermana

A mi familia

A mis amigos

A mis compañeros de laboratorio

ÍNDICE

Índice de figuras	I
Índice de tablas	II
Abreviaturas	III
Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1. Levonorgestrel como anticonceptivo de emergencia.....	4
1.2. El endometrio.....	6
1.3. Secreciones uterinas.....	9
1.4. Fisiología del espermatozoide.....	10
1.5. Papel de las secreciones uterinas y oviductales en la fisiología del espermatozoide.....	13
2. Justificación	16
3. Hipótesis	17
4. Objetivo general	17
4.1. Objetivos específicos.....	17
5. Material y métodos	18
5.1. Material biológico.....	18
5.2. Procesamiento de los lavados uterinos	19
5.3. Análisis de carbohidratos presentes en las proteínas de los lavados uterinos.....	19
5.3.1. Lectin-ELISA.....	19
5.3.2. Lectin-Blot.....	20
5.4. Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).....	20
5.5. Electroforesis bidimensional (2-DE).....	20
5.6. Identificación de proteínas.....	21
5.7. Western blot.....	22
5.8. Procesamiento de muestras de semen.....	22
5.9. Evaluación del efecto de proteínas endometriales sobre la función	

espermática.....	23
5.9.1. Movilidad espermática.....	23
5.9.1. Fosforilación de tirosinas.....	23
5.9.1. Reacción acrosomal.....	24
5.10. Inmunofluorescencia.....	24
5.11. Análisis estadístico.....	25
6. Resultados.....	26
6.1. Identificación de carbohidratos presentes en las proteínas de secreciones endometriales	26
6.2. Caracterización de proteínas de secreciones endometriales mediante SDS-PAGE y 2-DE.....	28
6.3. Análisis proteómico de los lavados uterinos.....	29
6.4. Secuenciación de proteínas.....	32
6.5. Presencia de lactoferrina en lavados uterinos.....	35
6.6. Efecto de la lactoferrina sobre la función espermática.....	37
6.7. Unión de la lactoferrina al espermatozoide.....	39
6.7. Presencia de glicodelina A en lavados uterinos.....	40
6.8. Efecto de glicodelina A sobre la función espermática.....	42
7. Discusión.....	46
8. Conclusiones.....	50
9. Bibliografía.....	51
Apéndice 1: Composición de medios y soluciones empleadas.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.1. Relación entre el intervalo de tiempo del coito sin protección y la administración del levonorgestrel en la tasa de embarazo.....	7
Fig. 1.2. Hormonas en el ciclo menstrual, desarrollo folicular y crecimiento endometrial.....	10
Fig. 1.3. Estructura del espermatozoide humano.....	13
Fig. 1.4. Interacción del espermatozoide con el ovocito.....	15
Fig. 5.1. Esquema temporal de la administración del levonorgestrel y la obtención de los lavados uterinos.....	20
Fig. 6.1. Análisis de carbohidratos presentes en lavados uterinos CTR y LNG de una donante mediante Lectin-ELISA.....	28
Fig. 6.2. Análisis de carbohidratos presentes en lavados uterinos CTR y LNG mediante Lectin-blot.....	30
Fig. 6.3. Caracterización de proteínas de lavados uterinos de una donante mediante electroforesis.....	31
Fig. 6.4. Análisis de proteínas de secreciones endometriales por medio de geles bidimensionales.....	32
Fig. 6.5. Proteínas de secreciones endometriales seleccionadas para secuenciar.....	34
Fig. 6.6. Identificación de lactoferrina en secreciones endometriales en SDS-PAGE.....	37
Fig. 6.7. Identificación de lactoferrina de secreciones endometriales en geles bidimensionales.....	38
Fig. 6.8. Efecto de lactoferrina sobre la movilidad de espermatozoides.....	39
Fig. 6.9. Efecto de lactoferrina sobre la fosforilación en tirosinas de proteínas espermáticas.....	40
Fig. 6.10. Efecto de lactoferrina sobre la reacción acrosomal espontánea e inducida por ionóforo de calcio.....	41
Fig. 6.11. Distribución de la lactoferrina en espermatozoides.....	42
Fig. 6.12. Identificación de glicodelina A en secreciones endometriales en	

SDS-PAGE.....	43
Fig. 6.13. Identificación de glicodelina A de secreciones endometriales en geles bidimensionales.....	44
Fig. 6.14. Efecto de glicodelina A sobre la movilidad de espermatozoides.....	43
Fig. 6.15. Efecto de glicodelina A sobre la fosforilación en tirosinas de proteínas espermáticas.....	46
Fig. 6.16. Efecto de glicodelina A sobre la reacción acrosomal espontánea e inducida por ionóforo de calcio.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1. Tabla 1.1. Tasa de embarazo observada con diferentes métodos de anticoncepción de emergencia de acuerdo al intervalo de tiempo entre el coito sin protección y el tratamiento.....	6
Tabla 5.1. Protocolo de isoelectroenfoque.....	23
Tabla 6.1. Análisis de cambios en las proteínas de lavados uterinos por el tratamiento con levonorgestrel por medio del software PD Quest.....	33
Tabla 6.2. Identificación de proteínas de lavados uterinos identificadas por espectrometría de masas.	44

ABREVIATURAS

2-DE	Electroforesis en geles bidimensionales
AAA	Aglutinina de <i>Aleuria aurantia</i>
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
Cal	Ionóforo de calcio (A23187)
Con A	Concavalina A
DBA	Aglutinina de <i>Dolichos biflorus</i>
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FITC	Isiotiocianato de fluoresceína
GdA	Glicodelina A
GPx	Glutación peroxidasa
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HRP	Enzima peroxidasa de rábano
HTF	Fluido tubárico humano
Jac	Jacalina - <i>Artocarpus integrifolia</i>
LC-MS	Espectrometría de masas por cromatografía de líquidos
LF	Lactoferrina
LH	Hormona luteinizante
LNG	Levonorgestrel
LU	Lavados uterinos
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica, NIH, EE.UU.
O.M.S.	Organización Mundial de la Salud
OPD	Ortofenilendiamina
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
PNA	Aglutinina de <i>Arachis hypogaea</i>

PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i>
RA	Reacción acrosomal
RCA 120	Aglutinina de <i>Ricinus communis</i>
SABP	Proteína de unión al ácido siálico
SBA	Aglutinina de <i>Glycine max</i>
SDS-PAGE	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes
SOD	Superóxido dismutasa
TBS	Solución amortiguadora de tris
UEA	Aglutinina de <i>Ulex europaeus</i>
WGA	Aglutinina de <i>Triticum vulgare</i>
ZP	Zona pelúcida

RESUMEN

La anticoncepción de emergencia es el tratamiento que pueden utilizar las mujeres para evitar un embarazo después de un coito sin protección. El método más utilizado es la administración de 1.5 mg de levonorgestrel hasta 5 días post-coito. Esta progestina inhibe la ovulación cuando su ingesta ocurre durante la fase folicular temprana y media del ciclo menstrual, pero se desconoce su mecanismo de acción durante la fase folicular tardía y la ovulación. Trabajos previos señalan que la administración del levonorgestrel en la fase periovulatoria induce cambios en la secreción de proteínas endometriales que pueden alterar algunas variables de la fisiología espermática, pero esas proteínas aún no han sido identificadas. Debido a esto, el objetivo de esta tesis fue estudiar los cambios en las proteínas secretadas por el útero de mujeres derivados por la administración de levonorgestrel a la dosis utilizada en anticoncepción de emergencia y determinar si las proteínas identificadas modulan la función espermática en humanos. Para ello, lavados uterinos obtenidos en la fase periovulatoria de un ciclo control y otro tratado con levonorgestrel se caracterizaron por medio de electroforesis en geles bidimensionales y se analizaron para determinar las proteínas que cambiaron por el tratamiento. Las proteínas de interés se identificaron por medio de espectrometría de masas y posteriormente se emplearon para evaluar su efecto sobre la movilidad, la fosforilación en tirosinas y la reacción acrosomal de espermatozoides humanos. Los resultados mostraron que el levonorgestrel provocó el aumento de 7 proteínas y la disminución de 26. Una de las proteínas que aumentó con el tratamiento fue la lactoferrina, la cual no tuvo efectos sobre la movilidad pero inhibió la fosforilación en tirosinas y el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal inducida por ionóforo de calcio. Por otra parte, la glicodelina A también aumentó con el levonorgestrel, si bien esta proteína no afectó ninguna de las variables espermáticas evaluadas a las concentraciones empleadas. Estos resultados sugieren que el levonorgestrel induce cambios en la secreción de proteínas endometriales con consecuencias negativas para la interacción de gametos y por ende para la fecundación.

ABSTRACT

Emergency contraception is the treatment that women can use to prevent pregnancy after unprotected intercourse. The most commonly used method is the administration of 1.5 mg of levonorgestrel until 5 days post-coitus. This progestin inhibits ovulation when intake occurs in early and mid follicular phase, but its mechanism of action during the late follicular phase and ovulation is unknown. Previous studies indicate that administration of levonorgestrel in the periovulatory phase induces changes in the secretion of endometrial proteins that can modify some sperm physiology variables, although those proteins have not been identified yet. Because of this, the aim of this work was to study changes in proteins secreted by the uterus of women as a result of the administration of levonorgestrel at the dose used in emergency contraception and determine whether the identified proteins modulate sperm function in humans. For this, uterine flushings obtained during the periovulatory phase of a control cycle and a levonorgestrel treated cycle were characterized by two dimensional electrophoresis gels and analyzed to determine proteins that changed with the treatment. The proteins of interest were identified by mass spectrometry and its effects on motility, tyrosine phosphorylation and acrosome reaction of human sperm were evaluated. The results showed that levonorgestrel caused the increase of 7 proteins and the decrease of 26. One protein that increased with treatment was lactoferrin, which did not affect motility but inhibited tyrosine phosphorylation and decreased the percentage of sperm with induced acrosome reaction. On the other hand, glycodelin A also increased with levonorgestrel but this protein did not affect any of sperm variables evaluated at tested concentrations. These results suggest that levonorgestrel induces changes in endometrial protein secretion with negative consequences for gamete interaction and therefore for fertilization.

1. INTRODUCCIÓN

La alta frecuencia de embarazos no deseados y de abortos en condiciones inseguras para la mujer representa un grave problema de salud pública a nivel mundial. La anticoncepción de emergencia constituye una alternativa para reducir esta problemática, por lo que entender su mecanismo de acción es importante para su uso confiable. De acuerdo a la O.M.S., la anticoncepción de emergencia se define como el método que pueden utilizar las mujeres para prevenir un embarazo después de un coito sin protección [1].

Los compuestos empleados como anticonceptivos de emergencia han sido principalmente hormonas esteroides. Se utilizaron por primera vez en los años 20's en la práctica veterinaria, al observar que la administración de estrógenos en perras y yeguas interfería con la gestación [2]. Posteriormente, en los años 60's, se realizaron los primeros ensayos clínicos en seres humanos con el fin de evitar embarazos y posteriores abortos después de una violación. El esquema que se utilizaba era conocido como 5 x 5, el cual consistía en la administración de 5 mg de etinil estradiol por 5 días. Sin embargo, la administración de altas dosis de estrógenos generaba una alta incidencia de efectos secundarios como náuseas o fatiga entre las consumidoras [3].

En la década de 1970, Yuzpe y colaboradores propusieron la combinación de estrógenos con un progestágeno como anticonceptivo de emergencia, a lo que llamaron método de Yuzpe. Este consistía en la administración de 100 µg de etinil estradiol y 500 µg de levonorgestrel, una progestina sintética análoga a la progesterona. Por medio de este esquema se impedía la implantación del embrión al provocar cambios en el endometrio. Debido a que el método de Yuzpe empleaba dosis más bajas de estrógenos en comparación con el esquema 5x5 se observó una disminución en la incidencia de efectos secundarios [4].

Años más tarde, con el propósito de evitar los efectos anti-implantatorios que mostraba el método de Yuzpe, se realizaron protocolos en los cuales se administraban píldoras que contenían únicamente levonorgestrel, observándose que era capaz de inhibir la ovulación y por lo tanto disminuía la probabilidad de embarazo [5]. En estudios posteriores se mostró que el esquema del levonorgestrel era más eficaz que el método de Yuzpe en prevenir embarazos cuando se administraba en las 72 horas posteriores al coito sin protección [6] (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Tasa de embarazo observada con diferentes métodos de anticoncepción de emergencia de acuerdo al intervalo de tiempo entre el coito sin protección y el tratamiento [6].

Intervalo coito-tratamiento	Embarazo/Total de mujeres	Tasa de embarazo
≤24h		
Yuzpe	9/459	2.0
Levonorgestrel	2/450	0.4
25-48 h		
Yuzpe	15/370	4.1
Levonorgestrel	4/338	1.2
49-72 h		
Yuzpe	7/150	4.7
Levonorgestrel	5/187	2.7

En años recientes, se han descrito otras alternativas en anticoncepción de emergencia, como el danazol, un esteroide sintético con acción androgénica débil que inhibe la secreción de gonadotropinas, o la mifepristona (RU486), un antigestágeno con efectos anti-implantatorios [2]. Sin embargo, en la actualidad el levonorgestrel es el método más utilizado por su alta eficacia y por su baja incidencia de efectos colaterales no deseados.

1.1. Levonorgestrel como anticonceptivo de emergencia

El levonorgestrel es una progestina sintética derivada del 19-nortestosterona que tiene gran afinidad por los receptores de progesterona y testosterona [7]. Sin embargo, se ha mostrado que uno de sus metabolitos, el 3β, 5α-levonorgestrel el cual es tetrahidro reducido en el anillo A, es capaz de activar los receptores α y β de estrógenos [8, 9].

Esta progestina se utiliza como anticonceptivo al ser administrada oralmente o al ser liberada vía dispositivo intrauterino o en implantes subdérmicos. Se ha mostrado que la liberación de 20 µg al día del dispositivo intrauterino tiene una eficacia cercana a la esterilización, con una tasa de embarazo de 0 a 0.2% [10], mientras que en los implantes, la liberación de 30 µg al día muestra una efectividad hasta por 5 años [11].

Para que funcione como anticonceptivo de emergencia, el levonorgestrel se administra oralmente en dos dosis de 0.75 mg con 12 horas de separación o una dosis simple de 1.5 mg [12]. Se ha estimado que cuando se utiliza en las 72 horas posteriores a la relación sexual, la tasa de embarazo es del 4% y en el quinto día esta tasa aumenta un 10% [13] (Fig. 1.1). Esto demuestra que su eficacia disminuye a medida que incrementa el intervalo de tiempo entre la relación sexual y el tratamiento.

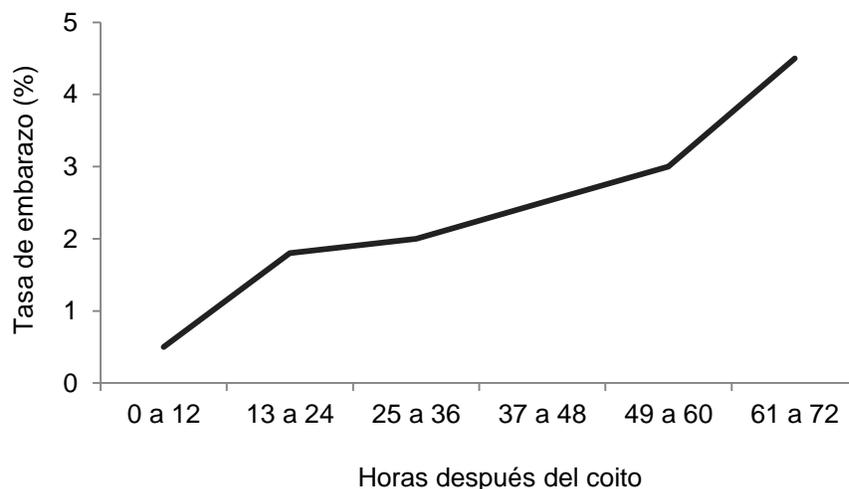


Fig. 1.1. Relación entre el intervalo de tiempo del coito sin protección y la administración del levonorgestrel en la tasa de embarazo [13].

En diferentes investigaciones se ha demostrado que los efectos anticonceptivos del levonorgestrel sobre el aparato reproductor femenino varían según el momento del ciclo en que se administre. Su ingesta durante la fase folicular temprana y media inhibe la ovulación pero no así en la fase folicular tardía [14], por lo que se ha

propuesto que otros mecanismos podrían proporcionar la protección anticonceptiva observada en esta etapa, mismos que aún se desconocen. A este respecto, se ha descrito que la administración de esta progestina tiene la capacidad de aumentar la densidad del moco cervical, lo que dificultaría el paso de los espermatozoides a la cavidad uterina y por ende a la trompa [15]. Por otra parte, diversos trabajos se ha mostrado que el levonorgestrel no tiene efectos anticonceptivos posteriores a la fecundación, en particular los relacionados con los mecanismos de implantación y post-implantación, por lo cual no se le puede considerar como un método abortivo [16, 17].

Otro mecanismo de acción propuesto es que el levonorgestrel podría tener efectos sobre la función espermática que comprometerían su capacidad para fecundar. Se ha demostrado que una concentración de 100 ng/ml altera algunos parámetros funcionales de movilidad [18] y que a concentraciones superiores a 200 ng/ml promueve la reacción acrosomal prematuramente, todo lo cual interfiere con la capacidad de fertilizar del espermatozoide [19]. Sin embargo, estudios farmacocinéticos muestran que la concentración máxima en suero de levonorgestrel es de 5-10 ng/ml, la cual se observa a las dos horas post-administración de 0.75 mg del fármaco con una vida media de 14.5 horas [20], lo que sugiere que el levonorgestrel *per se* difícilmente afecta la capacidad de fecundar de los espermatozoides cuando están en el tracto reproductor femenino.

Por esta razón, se ha sugerido que el levonorgestrel podría modificar el patrón de secreción de proteínas del endometrio y que a su vez dichas proteínas podrían alterar la función espermática [21]. Por tanto, es importante analizar las secreciones del endometrio y estudiar su posible acción sobre la fisiología del espermatozoide.

1.2. El endometrio

El endometrio es el revestimiento interior del útero que lleva a cabo funciones indispensables para la iniciación y el mantenimiento del embarazo. Desde la pubertad hasta la menopausia, el endometrio experimenta cambios cíclicos

aproximados de 28 días bajo el control hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, lo que se denomina ciclo menstrual. Este consta de dos etapas: la fase folicular o proliferativa y la fase secretora, progestacional o lútea.

La fase proliferativa se desarrolla bajo la influencia de los estrógenos secretados por el ovario y es paralela al crecimiento de los folículos ováricos el cual es mediado por la creciente secreción de la hormona folículo estimulante (FSH). En esta etapa, las células del estroma y las células epiteliales proliferan con rapidez. Antes de la ovulación se produce un aumento en la secreción de estrógenos, lo cual conlleva un aumento en la secreción de la hormona luteinizante (LH) que induce la expulsión de un ovocito. Por su parte, el endometrio aumenta de espesor debido al creciente número de células del estroma y al crecimiento progresivo de las glándulas uterinas y de nuevos vasos sanguíneos en el interior del endometrio.

La fase secretora inicia alrededor de 2 a 3 días después de la ovulación en respuesta a la progesterona producida por el cuerpo lúteo. Durante esta etapa, las glándulas uterinas y las arterias formadas a partir del endometrio se hacen tortuosas y se identifican tres capas: una compacta superficial, una capa esponjosa intermedia y una capa basal delgada. En las células de la capa esponjosa se acumulan sustancias de secreción como el glucógeno y aumentan los depósitos de lípidos en las células del estroma, mientras que el aporte sanguíneo en el endometrio sigue incrementándose. El objetivo general de todas estas modificaciones endometriales es producir un endometrio muy secretor que contenga grandes cantidades de nutrientes almacenados, capaz de ofrecer las condiciones adecuadas para la implantación del blastocisto [22, 23].

Si no se produce la fecundación se inicia el desprendimiento del endometrio, lo cual indica el inicio de la menstruación. Durante los 3 ó 4 días siguientes, las capas compacta y esponjosa son expulsadas del útero y sólo se mantiene la capa basal del endometrio. Esta capa está irrigada por sus propias arterias y funciona como

capa regenerativa para la reconstrucción de las glándulas y las arterias en la fase proliferativa siguiente (Fig. 1.2).

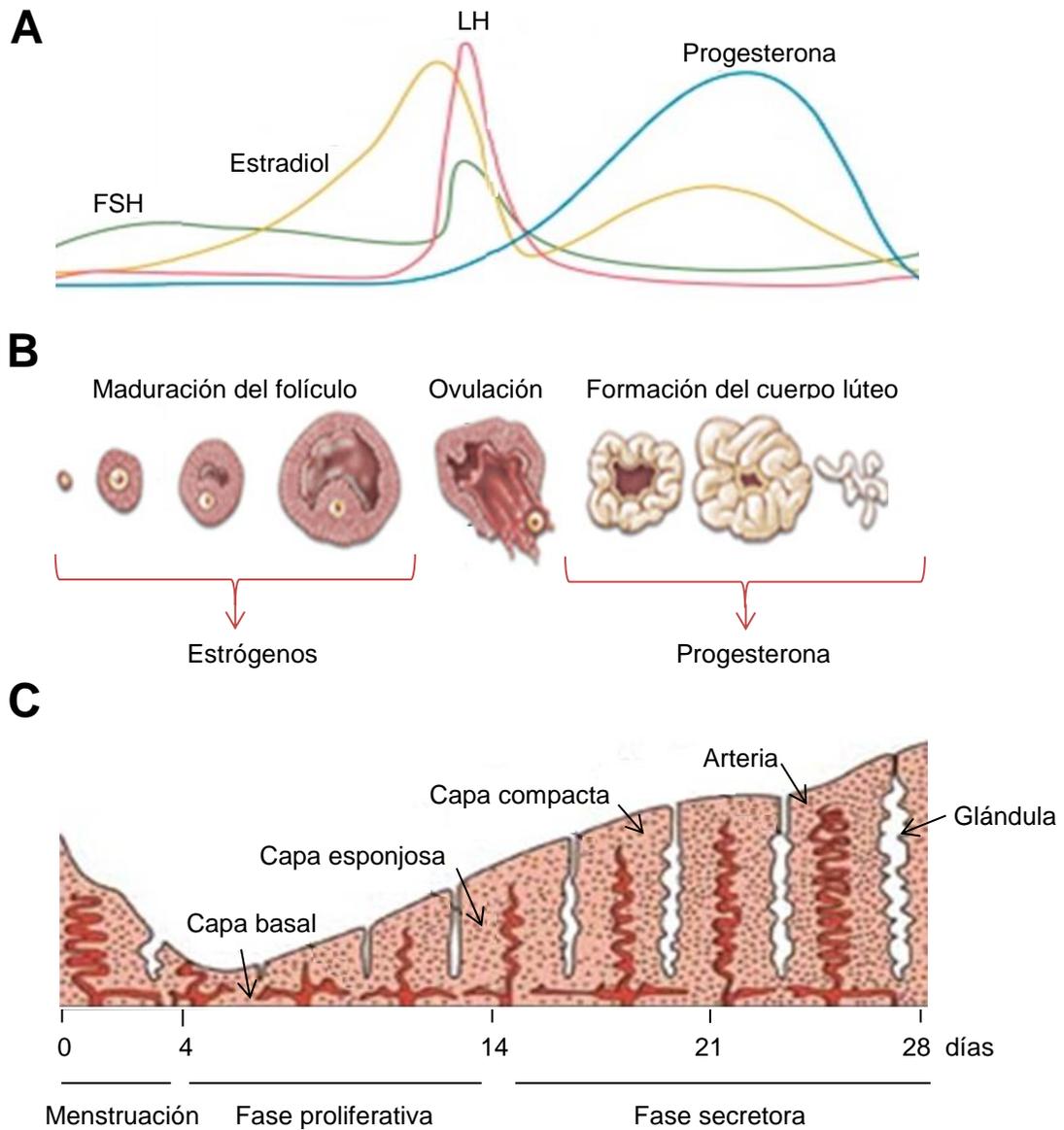


Fig. 1.2. (A) Hormonas en el ciclo menstrual, (B) desarrollo folicular y (C) crecimiento endometrial [24].

1.3. Secreciones uterinas

Los componentes de los fluidos uterinos provienen de las secreciones del epitelio esponjoso del endometrio y del fluido tubárico [25]. Entre sus componentes se han descrito proteínas, prostaglandinas, hormonas esteroides, factores de crecimiento, iones y nutrientes [26]. Particularmente se ha mostrado que la concentración de potasio es alta en comparación con otros iones [27, 28]. En comparación con el suero, los fluidos uterinos tienen una menor concentración de cationes, lo cual podría ser un mecanismo regulatorio para mantener la electroneutralidad cuando la concentración de proteínas disminuye, las cuales regularmente tienen carga negativa. También se ha mostrado que la albúmina se encuentra en una menor concentración, lo cual permite mantener la osmolaridad entre el suero y los fluidos uterinos [29]. Por otra parte, se han descrito altas concentraciones de varios aminoácidos, entre los que predomina la taurina cuya concentración es 400 veces más alta en comparación con el suero durante la fase lútea. Los autores argumentan que las altas concentraciones de aminoácidos probablemente son el resultado de una secreción endometrial activa y que la taurina podría contribuir en la regulación osmótica entre el suero y los fluidos uterinos [30].

Las proteínas secretadas varían entre las diferentes fases del ciclo menstrual. El análisis de biopsias endometriales por medio de electroforesis en geles bidimensionales ha permitido la identificación de 196 proteínas que se expresan diferencialmente entre la fase proliferativa y la lútea [31]. Entre las proteínas que cambian se encuentra la albúmina, la cual es más abundante en la fase proliferativa. Se ha descrito que esta proteína es capaz de remover el colesterol y otras moléculas de la superficie del espermatozoide [32], evento que es indispensable para que este gameto al pasar por el tracto reproductor femenino adquiera su capacidad de fecundar.

Otras proteínas que cambian entre las fases del ciclo menstrual son las proteínas de choque térmico (HSP). Específicamente se ha observado que Hsp60, Hsp70 y Hsp27 aumentan después de la ovulación. Los autores sugieren que el cambio de la

abundancia de estas proteínas podría contribuir a proteger al endometrio de la liberación de citosinas provocada por la acumulación de leucocitos que ocurre en la fase lútea [33].

Todo lo anterior, sugiere que una secreción diferencial en las proteínas puede ser importante para la fertilización y para la implantación del embrión en desarrollo.

1.4. Fisiología del espermatozoide

El espermatozoide es la célula sexual masculina producto final de la espermatogénesis. Se compone de dos estructuras, la cabeza y el flagelo. La cabeza contiene un núcleo haploide con el material genético condensado. Además, en el extremo anterior de la cabeza, se localiza el acrosoma que es una vesícula derivada del aparato de Golgi. El acrosoma se compone de una membrana acrosomal interna cerca del núcleo, una membrana acrosomal externa por debajo de la membrana plasmática y un segmento ecuatorial donde esos dominios membranales se unen (Fig. 1.3). En el interior de este organelo se encuentra la matriz acrosomal y una fracción soluble que contiene gran cantidad de enzimas como hialuronidasas, neuraminidasas y proteasas como la acrosina, las cuales participan durante la penetración del cumulo oóforo y la zona pelúcida (ZP) del ovocito durante la fecundación [34].

El flagelo está constituido por un axonema, el cual consiste de un par de microtúbulos centrales rodeado por nueve pares de microtúbulos. Se compone de la pieza de conexión, la pieza media, la principal y la terminal. En la pieza media se localizan las mitocondrias que proporcionan la energía necesaria para mover el espermatozoide dentro del aparato reproductor femenino [35].

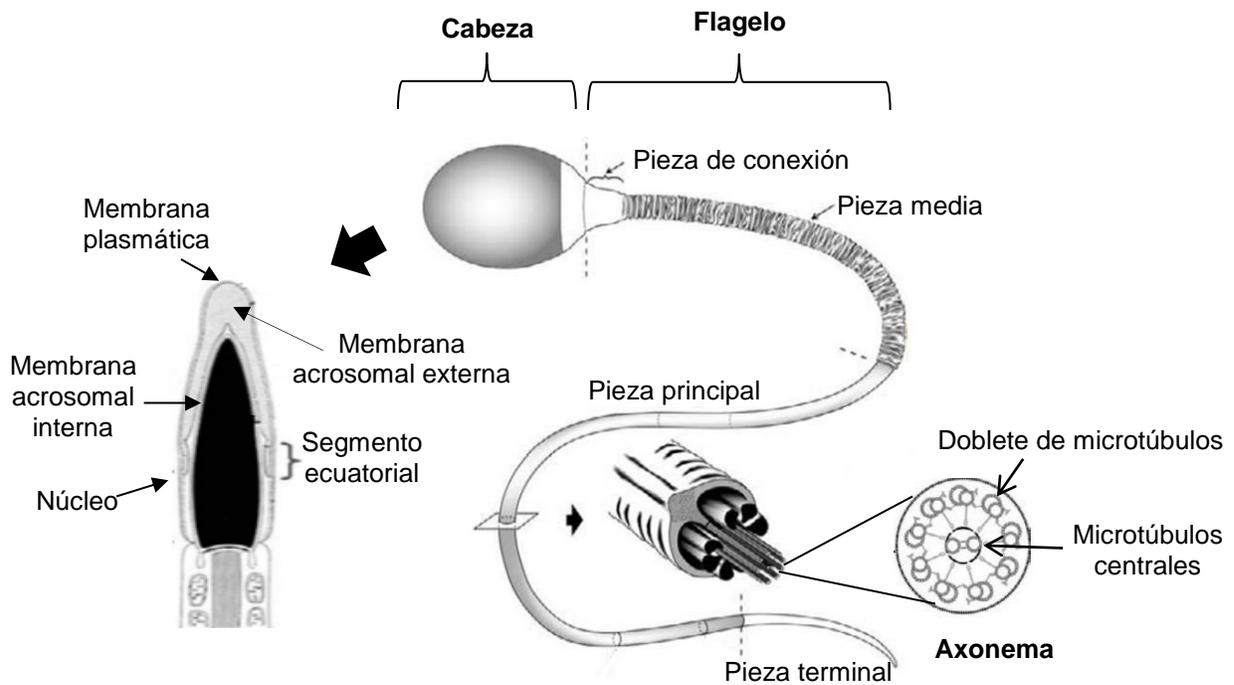


Fig. 1.3. Estructura del espermatozoide humano [34].

Para que el espermatozoide pueda fecundar al ovocito es necesario que migre por el tracto reproductor femenino desde el cérvix, donde el semen es depositado, hasta el ámpula de la trompa de Falopio. A lo largo de este trayecto, entra en contacto con las secreciones del útero y del oviducto que modulan su función y lo habilitan para fecundar, proceso conocido como capacitación [36]. Entre las moléculas necesarias para la capacitación se han identificado la albúmina, el bicarbonato y el calcio [37].

Durante este proceso, los espermatozoides exhiben cambios bioquímicos que incluyen la remoción de colesterol de la membrana plasmática de la cabeza, así como de algunas glicoproteínas adquiridas durante su paso por el epidídimo [38]. Se ha descrito que ocurre un incremento en la concentración intracelular de calcio, proveniente del medio extracelular a través de canales iónicos membranales como CatSper y de los depósitos intracelulares de calcio que se encuentran en el acrosoma y en las mitocondrias [39]. Este aumento de calcio conlleva a cambios en

la movilidad, de un movimiento progresivo y rápido a uno no progresivo, lo cual se conoce como hiperactivación. Otro cambio importante durante este proceso es el aumento de la fosforilación en residuos de tirosinas de diversas proteínas espermáticas, el cual está mediado por la vía del AMPc / proteínas cinasas [40]. Entre las proteínas que se fosforilan se han descrito la proteína anclada a la cinasa A 82 (AKAP82) y su precursor la pro-AKAP82 [41], también conocidas como p82 y p110, respectivamente, debido a sus pesos moleculares [42]. Estas proteínas se localizan en el flagelo de los espermatozoides y se ha mostrado que su fosforilación es importante para la movilidad del gameto [43]. Adicionalmente, se ha mostrado la fosforilación de serinas y treoninas durante la capacitación [44] como la serina 473 de la proteína AKT [45].

Por otra parte, también se presentan modificaciones en la membrana plasmática de los espermatozoides como cambios en el potencial de membrana que provocan un aumento en su fluidez y permeabilidad [46]. Estos cambios son necesarios para que se lleve a cabo la reacción acrosomal, la cual es un proceso de exocitosis donde se fusionan la membrana acrosomal externa y la membrana plasmática de la cabeza, permitiendo la liberación del contenido enzimático del acrosoma [47]. Este fenómeno es estimulado de forma natural por la progesterona [48] y por las proteínas ZP1 [49], ZP3 y ZP4 [50] que conforman la zona pelúcida, cuyos receptores se localizan en la membrana plasmática de la célula. También puede ser inducida por fármacos como el ionóforo de calcio A23187 (Cal) [51]. En cuanto a esto, se ha descrito que el aumento en la fosforilación de la proteína pro-AKA82 se acompaña de un aumento en el porcentaje de espermatozoides que tienen reacción acrosomal en presencia de Cal [52]. Por otra parte, estudios *in vitro* han demostrado que durante la capacitación una pequeña fracción de espermatozoides puede presentar reacción acrosomal de forma espontánea, perdiendo su capacidad de fecundar al ovocito [53]. Una vez que el espermatozoide está reaccionado, la ZP2 actúa como receptor secundario del gameto mediando la penetración de la zona pelúcida [54]. Así, el espermatozoide atraviesa la zona pelúcida, alcanza el espacio perivitelino y se une a la membrana plasmática del ovocito para fusionarse con ella,

lo cual le permitirá a su vez la fusión de los pronúcleos para así dar origen al cigoto (Fig. 1.4).

Los cambios que presenta el espermatozoide durante el proceso de capacitación son regulados por moléculas presentes en el tracto reproductor femenino [34]. Diversos estudios han mostrado la presencia de receptores a progesterona [55], andrógenos, estrógenos [56] e interleucinas [57].

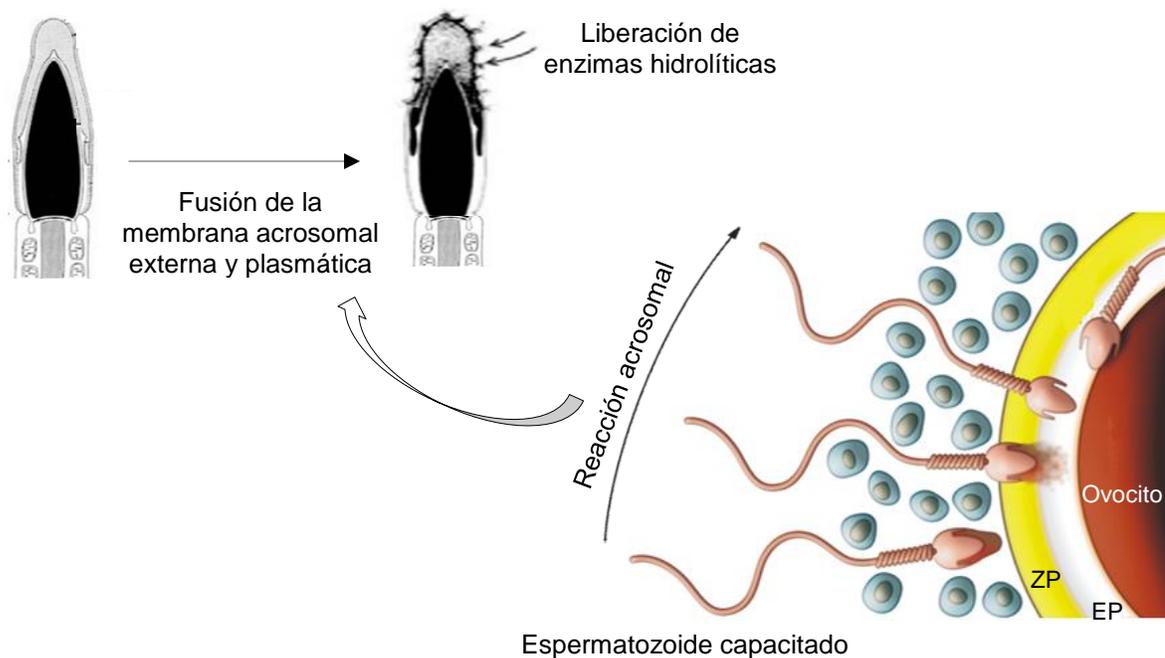


Fig. 1.4. Interacción del espermatozoide con el ovocito. EP= espacio perivitelino, ZP= zona pelúcida. Modificado de Ikawa (2010) [38] y Eddy (2006) [34].

1.5. Papel de las secreciones uterinas y oviductales en la fisiología del espermatozoide

Dado que la capacitación espermática ocurre durante el paso de esta célula por el tracto reproductor femenino, las moléculas secretadas por el útero y el oviducto también son capaces de modular este proceso. Cuando los espermatozoides son depositados en la vagina entran en contacto con el moco cervical, el cual participa

en el proceso de capacitación al eliminar las moléculas adsorbidas durante el tránsito y almacenamiento de los espermatozoides en el epidídimo y durante su suspensión en el plasma seminal como glicoproteínas, colesterol y lípidos [38]. Asimismo, el moco cervical actúa comoceptor del colesterol que se encuentra en la membrana plasmática de los espermatozoides [58].

En cuanto a la participación del endometrio en la capacitación espermática, se ha descrito que las células endometriales secretan interleucina-6, la cual tiene la capacidad de aumentar la fosforilación de proteínas en el espermatozoide [59]. El endometrio secreta también la proteína de unión al ácido siálico (SABP), que captura el ácido siálico presente en la superficie de la cabeza de los espermatozoides no capacitados y permite la exposición de los sitios de unión a D-manosa en la superficie del espermatozoide, mismos que participan en el reconocimiento con la zona pelúcida [60]. Por otra parte, la interacción del espermatozoide con las células epiteliales del oviducto le brindan protección contra el estrés oxidativo al estimular la actividad intracelular de SOD y GPx, dos enzimas antioxidantes que evitan el aumento intracelular de las especies reactivas de oxígeno, mismos que promueven la peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática y la fragmentación del ADN [61].

Sin embargo, la modulación de las secreciones del oviducto sobre la capacitación espermática es un tema controversial. Por una parte, se ha descrito que la incubación de espermatozoides con medio condicionado de células del oviducto favorece la capacidad fertilizante del espermatozoide al mantener su viabilidad e hiperactivación [62, 63]. En cambio, Zumoffen y colaboradores [64] observaron que después de la incubación de espermatozoides con proteínas derivadas de explantes de tejido oviductal obtenidas en la fase folicular tardía y periovulatoria, disminuía la fosforilación de proteínas de forma dosis-dependiente.

Adicionalmente, se ha descrito la presencia de proteínas secretadas por el endometrio y el oviducto que intervienen en la interacción del espermatozoide con la

zona pelúcida. La proteína regulada por la glucosa 78 (Grp78) y la proteína de choque térmico 60 (Hsp60) se unen a la región acrosomal de los espermatozoides incrementando el influjo de calcio y así acelerando la pérdida de su acrosoma [65, 66]. Por otra parte, se han descrito proteínas capaces de unirse al espermatozoide y bloquear su interacción con la zona pelúcida, como son la glicodelina A (GdA) [67] y la lactoferrina (LF) [68].

La glicodelina A es una glicoproteína que pertenece a la familia de las lipocalinas, las cuales son pequeñas proteínas extracelulares que se unen a pequeños compuestos lipófilos y a receptores de membrana [69]. Se encuentra en abundancia en el fluido amniótico, aunque también está presente en el endometrio en donde es secretada por las células epiteliales durante la fase secretora. Posee propiedades inmunosupresoras, ya que durante el proceso de implantación suprime el sistema inmune de la madre para evitar el rechazo del embrión en desarrollo [70]. Se ha mostrado que la glicodelina A comparte el núcleo proteico con otras 3 isoformas de glicodelina de las que se diferencia por sus glicosilaciones, mismas que cambian sus propiedades y funciones. La glicodelina S es secretada por las vesículas seminales y mantiene al espermatozoide en un estado no capacitado; la glicodelina F se produce en las células foliculares del ovocito y previene la reacción acrosomal prematura a la vez que interfiere en la interacción entre el espermatozoide y la zona pelúcida, mientras que la glicodelina C es secretada por las células del cúmulo oóforo y promueve la interacción espermatozoide-zona pelúcida [71].

Por su parte, la lactoferrina es una glicoproteína que pertenece a la familia de las serotransferrinas, que se componen de dos lóbulos en los cuales se unen el ión Fe^{3+} y una cadena glicano [72, 73]. Esta proteína es secretada por las células epiteliales del ampulla y el istmo del oviducto presentando un pico en la fase periovulatoria [68]. Estudios previos han mostrado la presencia de esta proteína en tejido endometrial [74]. Entre las funciones descritas para la lactoferrina se encuentran la absorción del hierro y la modulación del sistema inmune [73].

2. JUSTIFICACIÓN

La anticoncepción de emergencia constituye una alternativa confiable para la prevención de embarazos no deseados, pero la naturaleza poscoital del método y la relativa falta de información sobre sus mecanismos de acción han contribuido a que en ocasiones se le considere como un método abortivo, dificultando su uso por las potenciales usuarias.

El levonorgestrel al ser utilizado como anticonceptivo de emergencia podría modificar el patrón de secreción de proteínas endometriales y dichas proteínas podrían alterar la función espermática con consecuencias negativas para la fecundación. Respecto a esto, Durand y colaboradores mostraron que en mujeres tratadas con levonorgestrel a la dosis utilizada como anticonceptivo de emergencia se presentó un incremento prematuro de la concentración de glicodelina A en la fase periovulatoria [21], la cual es una proteína que inhibe la interacción espermatozoide-zona pelúcida.

Resultados preliminares de nuestro grupo indican que las secreciones del tracto reproductor femenino obtenidos luego de la administración de levonorgestrel disminuye el número de espermatozoides móviles, inhibe la fosforilación de tirosinas y aumenta la reacción acrosomal espontánea en ensayos *in vitro* (Chirinos y cols., datos sin publicar), pero las moléculas responsables de dichos cambios no han sido estudiadas. El conocimiento sobre los mecanismos mediante los cuales la anticoncepción de emergencia modula las secreciones uterinas es necesario para su mejor entendimiento, así como para identificar moléculas presentes en el tracto reproductor femenino que pueden ser relevantes para la reproducción.

3. HIPÓTESIS

Si la administración del levonorgestrel genera cambios en el patrón de secreción de proteínas del endometrio, es posible que las proteínas secretadas afecten la capacidad fecundante del espermatozoide.

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar cambios en el contenido proteínico de secreciones uterinas periovulatorias de mujeres tratadas con levonorgestrel a la dosis utilizada en anticoncepción de emergencia.

4.1. Objetivos específicos

- Identificar proteínas secretadas por el endometrio que se modifican por el tratamiento con el levonorgestrel.
- Determinar si las proteínas identificadas modulan la función espermática en humanos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

Los lavados uterinos empleados para esta investigación se obtuvieron como parte de un proyecto de investigación a cargo de la Dra. Martha Durand (Departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ) [21]. Los lavados uterinos provenían de 12 mujeres con función ovárica normal y sin riesgo de embarazo con salpingoclasia bilateral, entre los 22 y 37 años de edad, con ciclos menstruales regulares con duración entre 25 y 34 días. Las voluntarias no utilizaron métodos anticonceptivos u otra medicación seis meses previos al estudio.

Los lavados uterinos se colectaron durante la fase periovulatoria (un día después del pico de la hormona luteinizante (LH)) de un ciclo control (sin tratamiento) y otro subsiguiente tratado con levonorgestrel, el cual fue administrado a la dosis utilizada como anticonceptivo de emergencia (dos dosis de 0.75 mg con 12 horas de separación) aproximadamente 2 días antes del pico de la LH (Fig. 5.1). El aumento de LH se determinó a través de un análisis colorimétrico de la orina que indica la máxima concentración de esta hormona. Asimismo se evaluó su concentración en suero. Los lavados uterinos fueron mantenidos a -70°C hasta el momento de su uso.

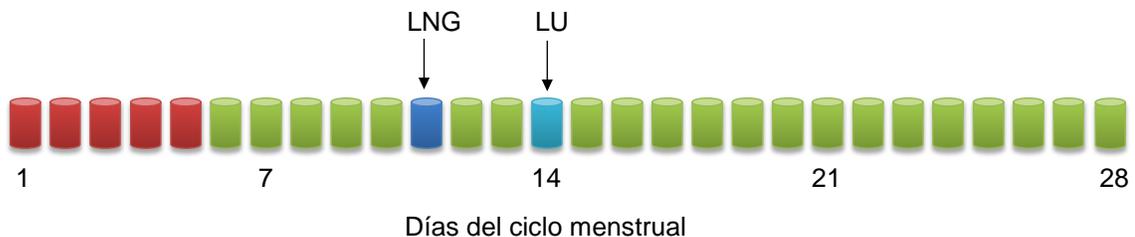


Fig. 5.1. Esquema temporal de la administración del levonorgestrel (LNG) y la obtención de los lavados uterinos (LU).

5.2. Procesamiento de los lavados uterinos

Los lavados uterinos fueron descongelados y centrifugados durante 30 minutos a 4°C para eliminar potenciales contaminantes arrastrados durante su colección. La concentración de las proteínas contenidas en los lavados uterinos se determinó por el método del ácido bicinonínico (BCA; Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). Posteriormente, los lavados uterinos se utilizaron para preparar una mezcla de lavados uterinos controles y otra de lavados uterinos tratados con levonorgestrel a partir de las muestras colectadas de 8 mujeres, en donde cada muestra aportó la misma cantidad de proteínas. Estas mezclas fueron empleadas en todos los experimentos presentados en esta tesis, a excepción de aquellos donde se indica el uso de muestras de una donante.

5.3. Análisis de carbohidratos presentes en las proteínas de los lavados uterinos

5.3.1. Lectin-ELISA

Los carbohidratos presentes en los lavados uterinos se estudiaron mediante Lectin-ELISA. Para ello, los pozos de placas de 96 pozos se cubrieron por triplicado con 100 ng/pozo de proteína de los lavados uterinos diluidos en PBS 50 mM (pH 7.4) (Apéndice 1) y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, los pozos se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS y después se incubaron durante 1 hora a 37°C con las lectinas biotiniladas: Con A, SBA, WGA, DBA, UEA, RCA 120, PNA, JAC, PSA [15 ng/ml] y AAA [5 ng/ml] (Vector Laboratories; Burlingame, CA, EE.UU.). Luego de lavar 3 veces con PBS-T (PBS+Tween 20 0.05%), los pozos se incubaron con avidina acoplada a HRP [5 ng/ml] (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, EE.UU.) durante 1 hora a 37°C. La detección se realizó empleando como sustrato OPD al 0.05% y H₂O₂ al 0.06% en solución de citratos (pH 5). La absorbancia se determinó en un lector de ELISA (Thermo Labsystems; Pittsburgh, PA, EE.UU.) a una longitud de onda de 492 nm

[75]. Los valores de absorbancia fueron normalizados contra un blanco para cada lectina.

5.3.2. Lectin-Blot

Para caracterizar los carbohidratos asociados a las proteínas de los lavados uterinos se utilizó la técnica de Lectin-Blot. Para ello, 25 µg de las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (ver apartado 5.4). Las membranas se bloquearon con BSA al 1% en PBS-T durante 1 hora y posteriormente se incubaron con las lectinas biotiniladas AAA, Con A, UEA I o PNA [10 µg/ml] durante 1 hora. Luego, se lavaron con PBS-T y se incubaron con avidina acoplada a HRP [1 ng/ml] (Sigma Chemical Co.). La señal se reveló mediante colorimetría empleando como sustrato diaminobenzidina más H₂O₂ [75].

5.4. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

La caracterización de las proteínas de lavados uterinos en función de su masa molecular se llevó a cabo por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE), al final de lo cual los geles se tiñeron con el colorante azul de Coomassie para observar el patrón de proteínas. Alternativamente, las proteínas separadas se electrotransfirieron para su análisis mediante Western Blot (ver apartado 5.7).

5.5. Electroforesis bidimensional (2-DE)

El contenido proteico de los lavados uterinos también se analizó mediante electroforesis en geles bidimensionales (2-DE). Para ello, se procesaron por triplicado para su análisis según el procedimiento descrito a continuación:

- Primera dimensión. Las proteínas se separaron con base en su punto isoeléctrico (carga neta), empleando un equipo de isoelectroenfoque modelo PROTEAN IEF Cell (Biorad; Hercules, CA, EE.UU.) siguiendo las indicaciones del manual que lo

acompaña. Para ello, 169 µg de proteína se diluyeron en buffer de rehidratación (Apéndice 1) en un volumen final de 125 µl. Las muestras se electroenfocaron en tiras de 7 cm de largo con diferentes rangos de pH (ReadyStrip IPG, Biorad) de acuerdo al protocolo inicial recomendado (Tabla 5.1).

- Segunda dimensión. Las proteínas electroenfocadas en la primera dimensión se separaron mediante SDS-PAGE como se describe en el apartado 5.4. En algunos casos se tiñeron para su análisis utilizando el software PD Quest (Bio-Rad) que permitió la detección de cambios en el patrón de proteínas. Sólo se consideraron aquellas proteínas que aumentaron el doble de su abundancia o que disminuyeron menos del 50% de su valor. En otros casos los geles se electrotransfirieron para su análisis mediante Western Blot (ver apartado 5.7).

Tabla 5.1. Protocolo de isoelectroenfoque.

	Voltaje	Tiempo	Volt/hora	Rampa
Paso 1	250	20 min	-	Lineal
Paso 2	4,000	2 h	-	Lineal
Paso 3	4,000	-	10,000 V-h	Rápida
Total		5 h	14,000 V-h	

5.6. Identificación de proteínas

Las proteínas de interés fueron cortadas de los geles y enviadas a secuenciar a la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología (UNAM) para su identificación. Se utilizó un equipo LC-MS constituido de un cromatógrafo líquido de micro-flujo Accela (Thermo-Fischer Co.; San Jose, CA, EE.UU.) y un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fischer Co.) con sistema de ionización tipo *nano-electrospray*. Los datos espectrométricos fueron contrastados contra la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando el programa ProteinProspector (Universidad de California, EE.UU.) y contra la base de datos de UniProt de Human en el Proteome Discoverer1.4 (<http://www.uniprot.org/>).

5.7. Western Blot

Para corroborar la presencia de proteínas específicas en los lavados uterinos, estos se separaron mediante SDS-PAGE (ver apartado 5.4) ó por 2-DE (ver apartado 5.5) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para su posterior detección mediante el uso de anticuerpos. Para ello, las membranas se bloquearon con BSA al 3% en solución amortiguadora TBS-T (TBS+Tween 20 0.1%) y a continuación se incubaron con un anticuerpo primario específico para cada proteína de interés. En el caso de la glicodelina A, se empleó un anticuerpo policlonal R-anti-hGdA [2 µg/ml] donado por el Dr. Markku Seppala (Departamento de Obstetricia y Ginecología, Universidad de Helsinki, Finlandia). Para la detección de lactoferrina se empleó un anticuerpo policlonal R-anti-hLF (Santa Cruz Biotechnology Inc., Sta. Cruz, CA, EE.UU.), diluido 1:1,000. Para evaluar la fosforilación de proteínas, se utilizó un anticuerpo monoclonal M-anti-fosfotirosinas (4G10; Millipore, Temecula, CA, EE.UU.), diluido 1:10,000 y como control de carga se utilizó un anticuerpo R-anti-β-tubulina (Sigma Chemical Co.) diluido 1:50,000.

En todos los casos, luego del anticuerpo primario se lavaron las membranas y se incubaron con un anticuerpo secundario apropiado acoplado a enzima peroxidasa de rábano (HRP) (Zymed; San Francisco, CA, EE.UU.) en una dilución 1:4,000. Finalmente, la señal específica se reveló mediante quimioluminiscencia (ECL Prime; GE Healthcare, Reino Unido) y la señal se detectó utilizando el equipo Chemi Doc™ XRS+ Imaging System (Bio-Rad).

5.8. Procesamiento de las muestras de semen

Se utilizaron muestras de semen de 12 donadores voluntarios normozoospermicos con un período de abstinencia de 3 a 5 días, las cuales se obtuvieron por masturbación y se incubaron durante 30 minutos a 37°C para permitir su licuefacción. Se evaluaron la viscosidad, el volumen, el pH, el color, la morfología, la movilidad y la densidad, siguiendo los procedimientos de la O.M.S. [76]. Posteriormente, los espermatozoides se separaron del fluido seminal por medio de

su centrifugación a través de un gradiente discontinuo de densidad (Isolate™; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EE.UU.). Los botones celulares resultantes se lavaron con PBS y se determinó nuevamente su densidad y porcentaje de células móviles. Sólo se emplearon las muestras que presentaron al menos 75% de células móviles.

5.9. Evaluación del efecto de proteínas endometriales sobre la función espermática

Los espermatozoides obtenidos según el apartado 5.8 se incubaron a una concentración de 15 mil espermatozoides/ μ l en condiciones capacitantes en medio fluido tubárico humano (HTF) (Apéndice 1), suplementado con BSA 0.3% y piruvato de sodio [0.33 mM] durante 3 horas. Las incubaciones se llevaron a cabo en ausencia o presencia de 1, 10, 100, 200 y 400 μ g de lactoferrina (Sigma Chemical Co.) o 10, 20, 40 y 60 μ g de glicodelina A (Abcam, Cambridge, MA, EE.UU.). La elección de estas concentraciones se basó en estudios previos donde mostraron que estas proteínas inhiben la interacción del espermatozoide con la zona pelúcida [67, 68]. Al final de las incubaciones, las muestras de espermatozoides se procesaron para analizar los efectos sobre la movilidad, la fosforilación de tirosinas y la reacción acrosomal.

5.9.1. Movilidad espermática

La evaluación de la movilidad espermática se realizó mediante observación de una gota de 10 μ l en un microscopio de contraste de fases, en donde se contaron 200 células que se clasificaron en móviles e inmóviles. Los datos obtenidos se expresaron como porcentaje de células móviles (% spm móviles).

5.9.2. Fosforilación de tirosinas

Los posibles efectos sobre la capacitación espermática se evaluaron analizando los cambios en la fosforilación en tirosinas de las proteínas espermáticas mediante Western blot. Para ello, luego de las incubaciones se tomaron 55 μ l de la muestra,

los cuales se lavaron 2 veces con PBS frío suplementado con los inhibidores ortovanadato de sodio [1 mM] y genisteína [0.02 mM]. Los botones celulares se resuspendieron en solución amortiguadora desnaturizante (Apéndice 1) para su análisis siguiendo los procedimientos descritos en el apartado 5.7 empleando el anticuerpo específico para fosfotirosinas. Además, se realizó la detección de β -tubulina en la misma membrana para corroborar la homogeneidad de la carga total de proteínas.

5.9.3. Reacción acrosomal

Para analizar el efecto en la reacción acrosomal se evaluaron dos variables: la reacción acrosomal espontánea y la inducida por Cal. Para la primera variable una alícuota de 10 μ l se lavó con PBS y se fijó con etanol al 70%. Otra alícuota de 10 μ l de la misma incubación se utilizó para evaluar la reacción acrosomal inducida, para lo cual los espermatozoides se incubaron con ionóforo de calcio A23187 (Cal) [10 μ M] (Sigma Chemical Co.) durante 20 minutos a 37°C, al final de lo cual se lavaron con PBS y se fijaron con etanol al 70%. Posteriormente, los espermatozoides fijados se emplearon para hacer frotis en laminillas pre-tratadas con poli-L-lisina y se tiñeron con la lectina PSA (*Pisum sativum agglutinin*) acoplada a isiotiocianato de fluoresceína (PSA-FITC). Luego, se analizaron un mínimo de 200 células/frotis en un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación de 460-495 nm y uno de emisión de 510-550 nm. Los espermatozoides que mostraron una tinción completa del acrosoma se consideraron intactos mientras que los que presentaban una tinción en la región ecuatorial o ausencia de tinción, se consideraron como reaccionados. Los valores obtenidos se expresaron como porcentaje de células con acrosoma reaccionado (% R.A.) [77].

5.10. Inmunofluorescencia

La localización de los sitios de unión de las proteínas endometriales en los espermatozoides se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia. Para ello, los espermatozoides incubados con las proteínas fueron fijados con etanol al 70% y se

realizaron frotis en laminillas con poli-l-lisina. Luego de lavar con PBS, se bloqueó con BSA al 1% en PBS y posteriormente se incubó con el anticuerpo policlonal R-anti-hLF (Santa Cruz Biotechnology Inc.) diluido 1:100, durante toda la noche a 4°C en una cámara húmeda. Después de lavar los frotis, se incubó con un anticuerpo secundario acoplado a fluoresceína GarlgG-FITC (Zymed) en una dilución 1:100, durante una hora en oscuridad. Los frotis se analizaron en un microscopio de fluorescencia y las imágenes se capturaron con una cámara Olympus modelo 501 (Melville, NY, EE.UU.).

5.11. Análisis estadístico

Los Lectin-blot y Western blots fueron analizados por medio de la densitometría total de cada uno de los grupos de estudio empleando el paquete de análisis Image Lab™ (Bio-Rad). La abundancia de carbohidratos de los lavados uterinos tratados con levonorgestrel fueron normalizados por el grupo control mientras que la abundancia de fosfotirosinas fue normalizada por la señal de tubulina (abundancia relativa). Los datos se analizaron utilizando el programa de análisis estadístico Graphpad Prism (Graphpad Software Inc.). Los resultados se analizaron con la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida por la de Tukey para comparaciones múltiples. Se consideraron diferencias significativas entre los grupos cuando la p era menor de 0.05.

6. RESULTADOS

6.1. Identificación de carbohidratos presentes en las proteínas de secreciones endometriales

Debido a que la mayoría de las proteínas de secreción están glicosiladas [78] y a que los carbohidratos intervienen en funciones importantes de las proteínas [79], se analizó la abundancia de carbohidratos presentes en los lavados uterinos y se caracterizaron los tipos de glicosilación presentes en las mismas por medio de Lectin-ELISA. En la figura 6.1, se muestra la abundancia relativa de diferentes carbohidratos entre los dos grupos de estudio, donde se observa que el tratamiento ocasionó una disminución aparente de la unión de las lectinas DBA y PSA y un aumento de UEA I, RCA 120, PNA y AAA. Sin embargo, solo el aumento de RCA 120 y AAA fue estadísticamente significativo. El resto de las lectinas evaluadas no mostraron cambios notables en la intensidad de señal.

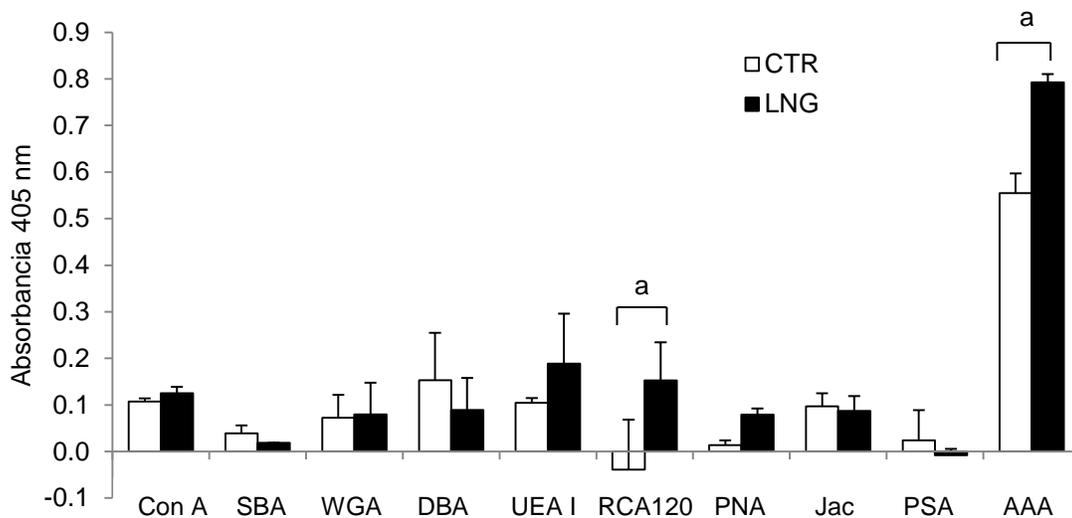


Fig. 6.1. Análisis de carbohidratos presentes en lavados uterinos CTR y LNG mediante Lectin-ELISA de una donante. Se muestran las medias de 3 réplicas + DE. (a) $p < 0.05$. CTR= control, LNG= tratado con levonorgestrel.

Los cambios observados podrían derivarse de modificaciones en el tipo de glicosilación en las proteínas o bien que las proteínas que se glicosilan en uno y otro caso son diferentes.

Con el propósito de estudiar los cambios en la distribución de los carbohidratos en las proteínas de los lavados uterinos tratados con levonorgestrel, se realizaron Lectin-Blots con las lectinas AAA, Con A, PNA y UEA I. En la figura 6.2.A se puede observar que el tratamiento con el levonorgestrel indujo un aumento de los carbohidratos que se unen con las lectinas AAA y PNA. En el caso de la AAA, la cual se une a N-acetilglucosamina, se observa un aumento en la mayoría de las proteínas, mientras que con PNA, la cual se une a galactosa, se observa un aumento en un rango de proteínas con peso molecular entre 55 y 75 kDa. Por otra parte, con Con A y UEA I que se unen a manosa y a fucosa respectivamente, se observa la aparición de glicosilaciones en proteínas específicas (indicadas con *) como consecuencia del tratamiento con el levonorgestrel.

En la figura 6.2.B se muestran las densitometrías totales de los Lectin-blots en donde se puede observar que la densidad relativa de las lectinas AAA y PNA aumentó considerablemente con el tratamiento. En cambio, con las lectinas Con A y UEA I no se detectaron cambios considerables, lo cual concuerda con el hecho de que se glicosilaron pocas proteínas con el tratamiento con el levonorgestrel.

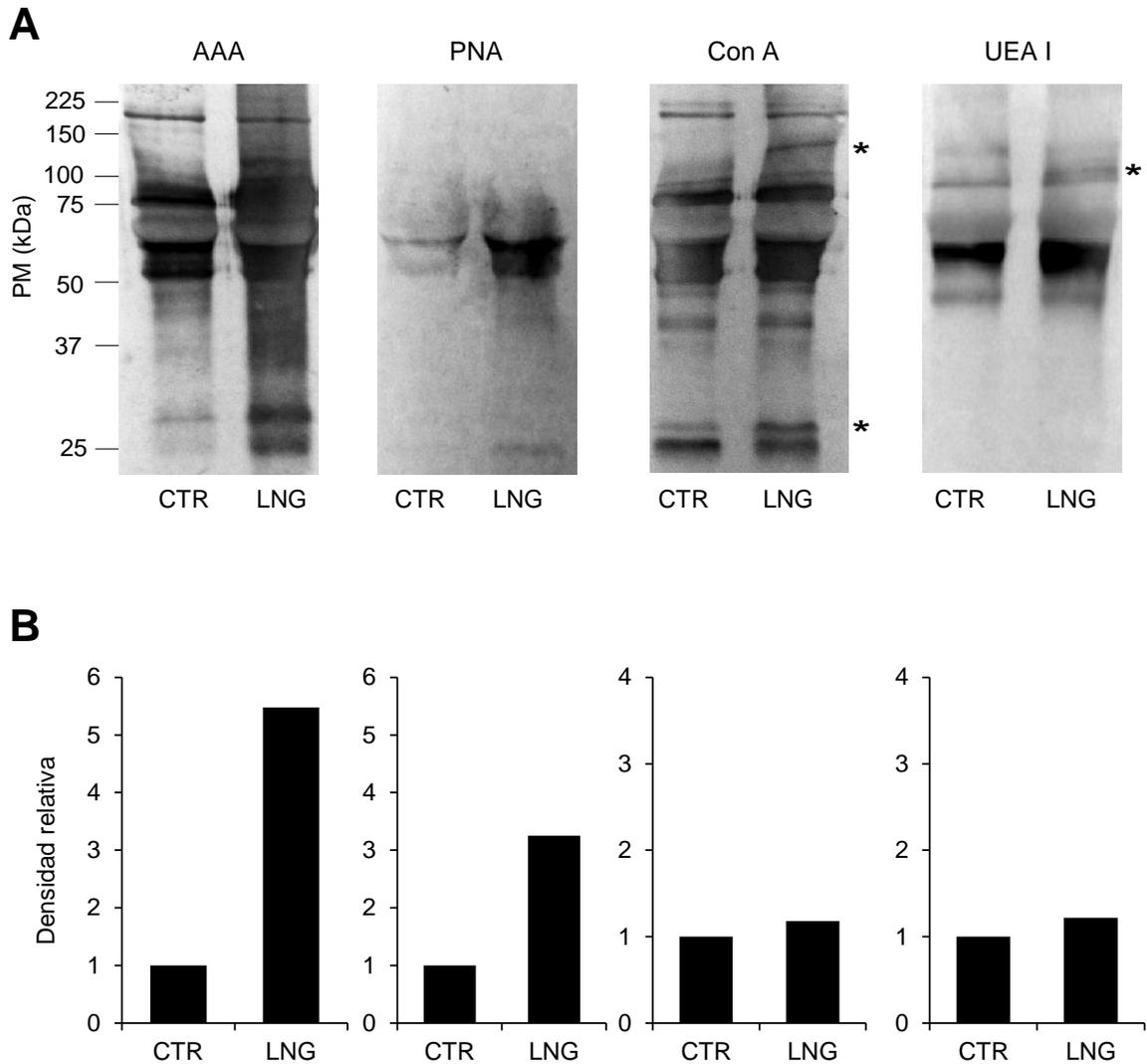


Fig. 6.2. Análisis de carbohidratos presentes en lavados uterinos CTR y LNG mediante Lectin-blot. (A) Lectin-blots. (B) Densitometría de la abundancia de carbohidratos. (*) = Proteínas glicosiladas por el tratamiento. CTR= control, LNG= tratado con levonorgestrel. (n=1).

6.2. Caracterización de proteínas de secreciones endometriales mediante SDS-PAGE y 2-DE

El contenido proteico de los lavados uterinos fueron analizados mediante electroforesis de una y dos dimensiones para comparar su efectividad en la separación y caracterización de las proteínas. En la figura 6.3.A se puede observar que mediante la técnica de SDS-PAGE no se observan diferencias entre el lavado uterino control y el tratado con levonorgestrel; en cambio, al separar las mismas

mezclas de proteínas por 2-DE (Fig. 6.3.B) se observó la disminución en la abundancia total de proteínas y en particular aquellas con un peso molecular inferior a 75 kDa. Cabe mencionar que se utilizó un rango de pH de 3-10 debido a que la mayoría de las proteínas tienen puntos isoeléctricos en este intervalo de pH, todo ello para observar el mayor número de proteínas que podrían cambiar con el tratamiento.

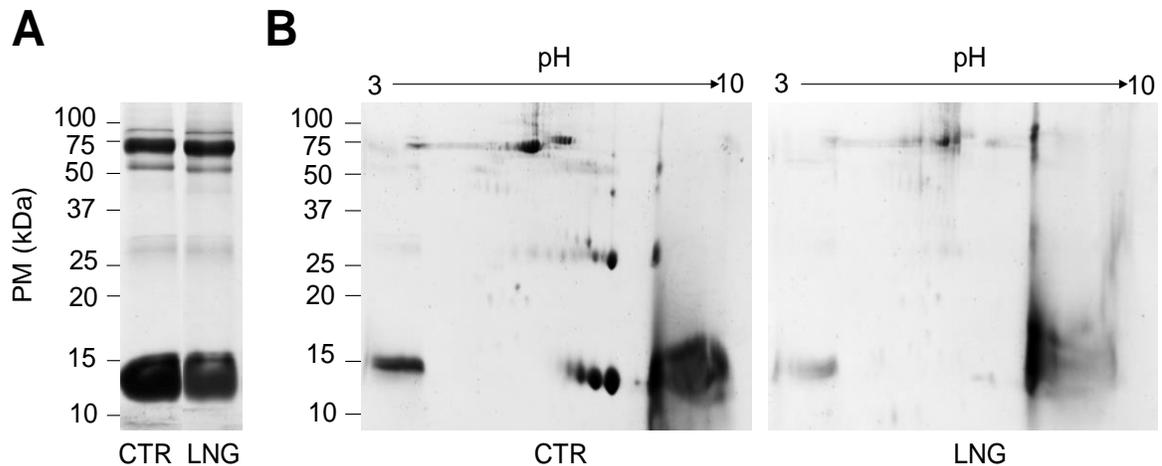


Fig. 6.3. Caracterización de proteínas de lavados uterinos de una donante mediante electroforesis. (A) SDS-PAGE de lavados uterinos CTR y LNG. (B) 2-DE de lavados uterinos CTR y LNG. CTR= control, LNG= tratado con levonorgestrel.

6.3. Análisis proteómico de los lavados uterinos

Las mezclas de proteínas de los lavados uterinos de ciclo control y tratado con levonorgestrel se separaron mediante 2-DE en un rango de pH de 3-10 (Fig. 6.4.A), observándose que la mayoría de las proteínas disminuyeron con el tratamiento. Adicionalmente, se observaron muchas proteínas con puntos isoeléctricos entre 6 y 8 y pesos moleculares entre 40 kDa y 75 kDa que no se resolvieron en las condiciones empleadas. A pesar de ello, el análisis de estos geles con el software PDQuest determinó que el tratamiento indujo el aumento de 5 proteínas y la disminución de 18 (nomenclatura en letras minúsculas) (Fig. 6.4.A y Tabla 6.1).

Para tener una mejor visualización de las proteínas que no se resolvieron bien, la misma mezcla de lavados uterinos se separó mediante 2-DE con un rango de pH de

5-8 (Fig. 6.4.B), en donde se lograron separar las proteínas de interés y el análisis de estos geles permitió detectar el aumento de otras 3 proteínas y la disminución de otras 8 (nomenclatura en letras mayúsculas) (Fig. 6.4.B y Tabla 6.1).

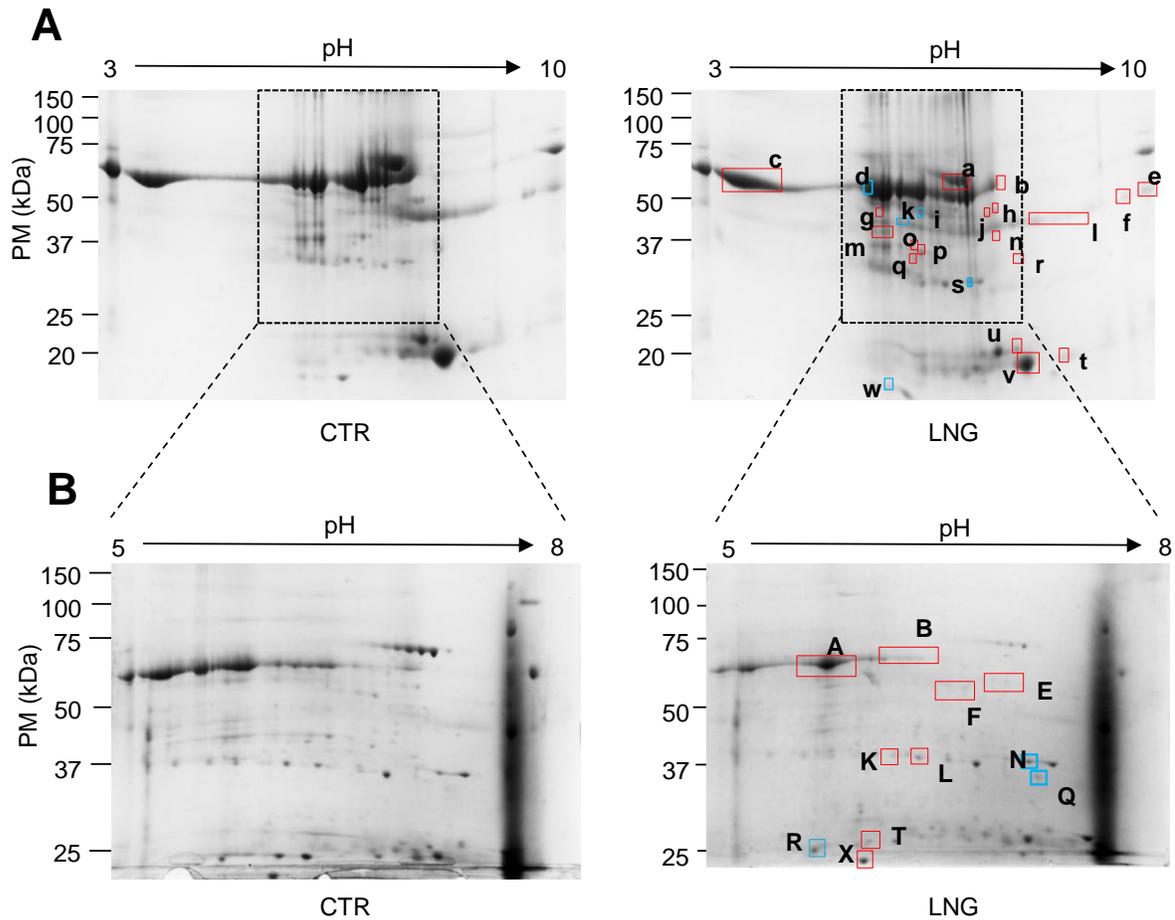


Fig. 6.4. Análisis de proteínas de secreciones endometriales por medio de geles bidimensionales. (A) Geles bidimensionales en un rango de puntos isoeléctricos de 3-10 de lavados uterinos CTR y LNG. (B) Geles bidimensionales en un rango de puntos isoeléctricos de 5-8 de lavados uterinos CTR y LNG. Los cuadros azules indican las proteínas que aumentaron con el tratamiento y los cuadros rojos las que disminuyeron. El recuadro en A equivale a la región que se abarca en el gel correspondiente con pH 5-8. CTR= control, LNG= tratado con levonorgestrel.

Tabla 6.1. Análisis de cambios en las proteínas de lavados uterinos por el tratamiento con levonorgestrel por medio del software PD Quest. PM= peso molecular, pI= punto isoeléctrico, LUCTR= lavado uterino periovulatorio control, LULNG= lavado uterino periovulatorio tratado con levonorgestrel.

Banda	PM (kDa)	pI	Densidad LUCTR (píxeles)	Densidad LULNG (píxeles)	LULNG/LUCTR	Efecto por LNG
a	67.83	5.94	189738.3	74605.9	0.39	↓
b	62.83	7.1	63868.1	13769.7	0.22	↓
c	62.7	4.5	1941107.1	780244.5	0.4	↓
d	59.95	5.34	100619.87	276093.47	2.74	↑
e	59.67	9.02	107177.47	36528.433	0.34	↓
f	58.26	8.84	79865.067	17300.633	0.22	↓
g	53.5	5.37	63874	19142.933	0.3	↓
h	52.66	7.16	19909.2	6688.5	0.34	↓
i	51.21	5.77	35592.2	77009.533	2.16	↑
j	49.9	6.91	56613.667	14449.9	0.26	↓
k	46.57	5.58	17142.4	40664.567	2.37	↑
l	45.79	7.16	1793597.03	292896.85	0.16	↓
m	43.6	5.38	33323.3	6774.4333	0.2	↓
n	43.24	6.83	15003.333	2866.2	0.19	↓
o	38.44	5.7	24826.567	10719.367	0.43	↓
p	37.38	5.78	70230.333	29067.167	0.41	↓
q	35.69	5.71	26431.067	4012.4	0.15	↓
r	34.23	7.43	60775.167	482.43333	0.01	↓
s	29.99	5.89	21954.9	50488.733	2.3	↑
t	18.7	8.5	58777.2	17652.25	0.3	↓
u	17.85	7.06	1964429.6	178847.85	0.09	↓
v	16.3	7.44	981417.57	723554.5	0.74	↓
w	13.71	5.5	23409	51174.4	2.19	↑
A	64.33	5.78	1047047.9	92748.45	0.09	↓
B	64.8	5.62	787485.35	204322.3	0.26	↓
E	63.06	5.98	332375.1	30300.2	0.09	↓
F	47.44	5.83	328705.65	3629.55	0.01	↓
K	41.17	5.65	590094.15	6039.3	0.01	↓
L	40.8	5.74	1392741.9	417835.55	0.30	↓
N	39.14	6.41	1375970	3095436.4	2.25	↑
Q	35.67	6.56	27702.3	1115128.7	40.25	↑
R	25.12	5.5	267625.35	667962.9	2.50	↑
T	25.2	5.6	275242.8	91464.4	0.33	↓
X	25.12	5.4	2711154.55	993661	0.37	↓

6.4. Secuenciación de proteínas

De las proteínas que cambiaron con el tratamiento, se enviaron para su identificación por espectrometría de masas aquellas que estaban bien separadas y cuya abundancia era suficiente para ser analizada. La figura 6.5 muestra un esquema de las proteínas que se cortaron de los geles con sus respectivos pesos moleculares y puntos isoeléctricos aproximados.

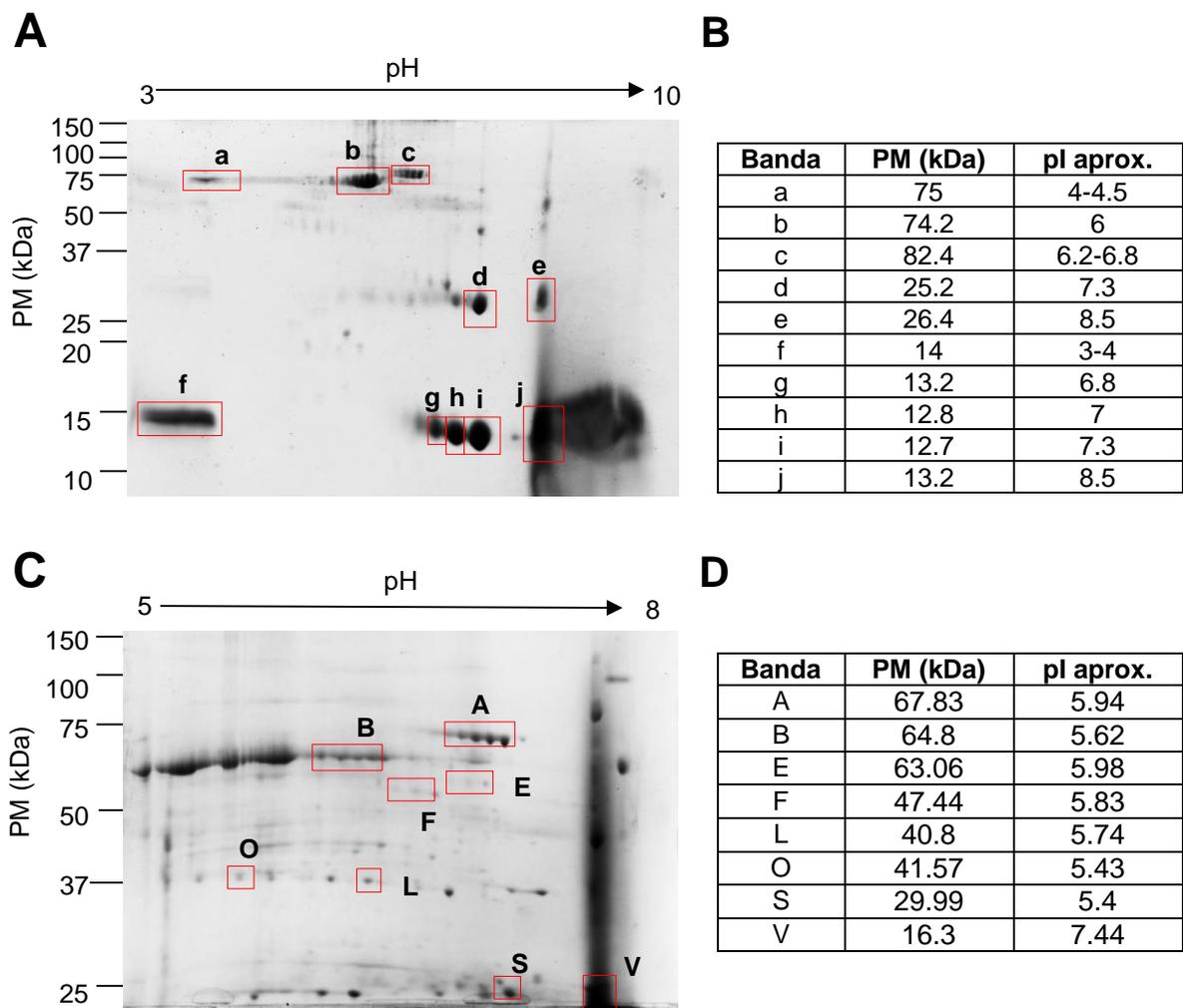


Fig. 6.5. Proteínas de secreciones endometriales seleccionadas para secuenciar. Geles bidimensionales de lavados uterinos de separados en un rango de puntos isoeléctricos de (A) 3-10 y (C) 5-8 en donde se indican las proteínas que se enviaron a secuenciar. (B y D) Propiedades físicas de las proteínas seleccionadas de los geles.

En la tabla 6.2 se muestran los resultados de la identificación de proteínas. Se puede observar que la mayoría de las proteínas identificadas por espectrometría de masas fueron variantes de albúmina y hemoglobina. La albúmina es una proteína que se encuentra en gran abundancia en los lavados uterinos [75]. En cambio, la presencia de hemoglobina junto con otras globinas nos indica contaminación de los lavados uterinos durante el procedimiento de recolección de las muestras. Adicionalmente, se identificó a la proteína “c” como un precursor de serotransferrina, la “A” como serotransferrina, la “L” como la cadena beta del fibrinógeno y la “O” como la proteína HP.

Tabla 6.2. Identificación de proteínas de lavados uterinos identificadas por espectrometría de masas. PM= peso molecular. El peso molecular calculado se obtuvo por medio del software PD Quest, mientras que el peso molecular teórico se obtuvo de una base de datos.

Banda	Número de acceso	Identidad	No. de peptidos localizados en la secuencia	% de cobertura	PM (kDa)		Efecto por LNG
					Calculado	Teórico	
a	113576	Albúmina	33	60.4	75.0	69.4	↓
b	113576	Albúmina	49	70.9	74.2	69.4	↓
c	4557871	Precursor de la serotransferrina	24	47.9	82.4	77.1	↓
d	183945	β-hemoglobina	11	83.7	25.2	15.9	↑
e	18418633	β-globina	11	72.3	26.4	16.1	↓
f	18418633	β-globina	10	77.6	14.0	16.1	↓
g	183945	β-hemoglobina	11	83.7	13.2	15.9	↓
h	183945	β-hemoglobina	14	89.8	12.8	15.9	↓
i	183945	β-hemoglobina	11	88.4	12.7	15.9	↑
j	18418633	β-globina	11	71.6	13.2	15.1	↓
A	Q53H26	Serotransferrina	35	57.2	67.8	77.0	↓
B	P02768	Albúmina	40	71.92	64.8	69.3	↓
E	F6KPG5	cDNA FLJ54111, similar a la serotransferrina	16	36.08	63.1	63.4	↓
F	P02768	Albúmina	38	66.34	47.4	69.3	↓
L	D3DP13	Cadena beta del fibrinógeno	19	63.66	40.8	39.7	↓
O	Q6NSB4	Proteína HP	17	50.18	41.6	31.4	↓
S	P68871	Subunidad beta de la hemoglobina	6	55.10	29.99	16.0	↓
V	P68871	Subunidad beta de la hemoglobina	12	88.44	16.3	16.0	↓

6.5. Presencia de lactoferrina en lavados uterinos

Debido a que la lactoferrina, una proteína cuya presencia en secreciones oviductales ya se ha descrito [68], es parte de la familia de las serotransferrinas que se identificaron en los lavados uterinos, decidimos determinar su presencia en los mismos mediante el uso de anticuerpos específicos. En la fig. 6.6.A se muestra que la carga de las proteínas de los lavados uterinos control y tratado con levonorgestrel separadas por SDS-PAGE es similar y al analizar estas mismas proteínas mediante Western blot con anticuerpo anti-LF (Fig. 6.6.B) se detectó en el lavado uterino con levonorgestrel una proteína de peso molecular aproximadamente de 78 kDa, el cual es similar al peso descrito para la lactoferrina. Para corroborar la especificidad del anticuerpo se incluyó un control de lactoferrina pura. Adicionalmente se detectaron dos bandas con pesos moleculares aproximados de 60 kDa y 52 kDa cuya identidad es desconocida, si bien podrían ser productos de degradación o variantes de esta proteína.

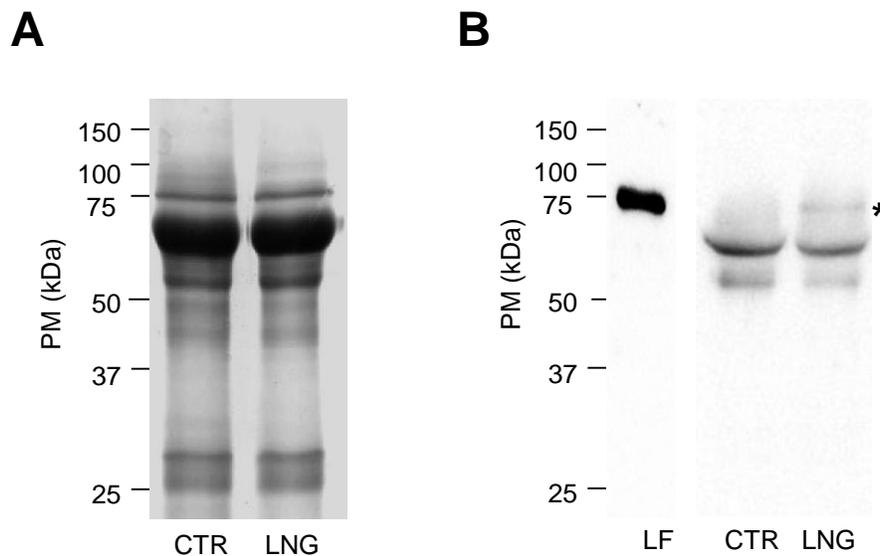


Fig. 6.6. Identificación de lactoferrina en secreciones endometriales en SDS-PAGE. (A) SDS-PAGE de lavados uterinos CTR y LNG. (B) Western blot con anticuerpo anti-LF de lavados uterinos CTR y LNG. Control positivo: lactoferrina pura (LF). (*) = peso molecular de lactoferrina. CTR= control, LNG= tratado con levonorgestrel.

Con el propósito de tener una caracterización más adecuada de la lactoferrina en los lavados uterinos, las proteínas se separaron mediante 2-DE (Fig. 6.7.A) y se electrotransfirieron para su análisis mediante Western blot. El anticuerpo reconoció varias manchas de pesos moleculares aproximados de 75, 60, 50 y 37 kDa con puntos isoeléctricos entre 6 y 8. Por otra parte, con esta técnica se observó un aumento considerable de la lactoferrina en los lavados uterinos tratados con levonorgestrel (Fig. 6.7.B) corroborando parcialmente lo observado en la figura 6.6. Las diferencias observadas con respecto al Western blot realizado con las proteínas separadas en geles de una dimensión, pueden deberse a una distorsión de la movilidad electroforética causada por el exceso de albúmina que se observa en esa región de peso molecular.

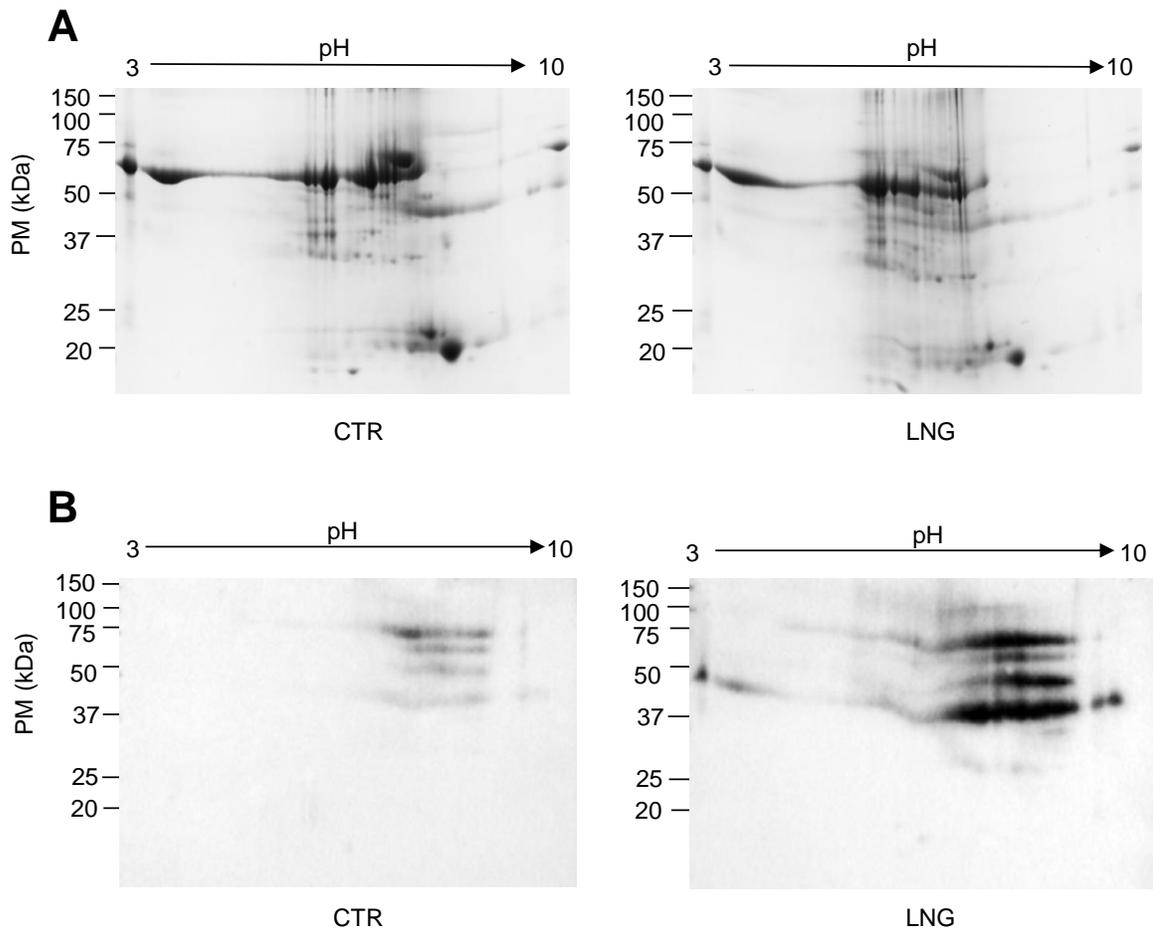


Fig. 6.7. Identificación de lactoferrina de secreciones endometriales en geles bidimensionales. (A) Geles bidimensionales de lavados uterinos CTR y LNG. (B) Western Blot con anticuerpo anti-LF de lavados uterinos CTR y LNG. CTR= control, LNG= tratado con levonorgestrel.

6.6. Efecto de la lactoferrina sobre la función espermática

Con el objeto de determinar si la lactoferrina participa en los cambios descritos en la función espermática, se evaluaron sus posibles efectos sobre la movilidad, la fosforilación de tirosinas y la reacción acrosomal.

En la figura 6.8 se muestran los valores de movilidad espermática a diferentes concentraciones de lactoferrina, donde se observa que no hubo cambios en el porcentaje de espermatozoides móviles en ninguna de las dosis empleadas.

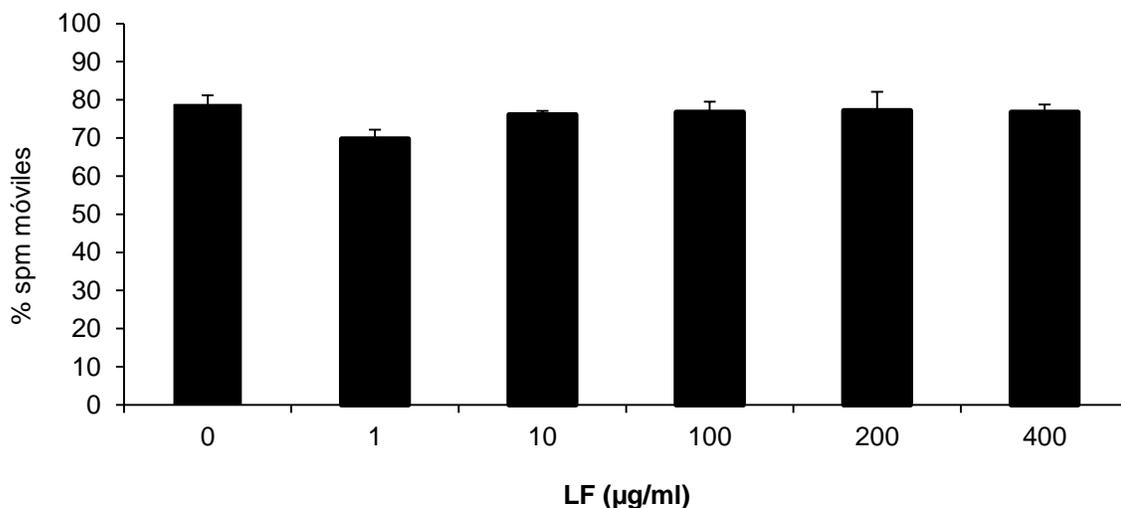


Fig. 6.8. Efecto de lactoferrina (LF) sobre la movilidad de espermatozoides. t=3h. n=8. Se muestran las medias + EE. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

Paralelamente, se analizó el efecto de la lactoferrina en la fosforilación de tirosinas para estimar la capacitación de las células. En la figura 6.9.A se muestran dos Western blots representativos de la fosforilación de tirosinas de espermatozoides con diferentes concentraciones de lactoferrina, en donde se observa que la fosforilación del control a las 3 horas de incubación es mayor en comparación con el control al tiempo 0, indicando que los espermatozoides se capacitaron durante la incubación. Por otra parte, se observa que la lactoferrina no tuvo efectos sobre la fosforilación de tirosinas excepto a una concentración de 400 µg/ml donde se observa una menor fosforilación. Estos resultados fueron consistentes, y al analizar

las densitometrías de cinco Western blots se corroboraron estos resultados (Fig. 6.9.B).

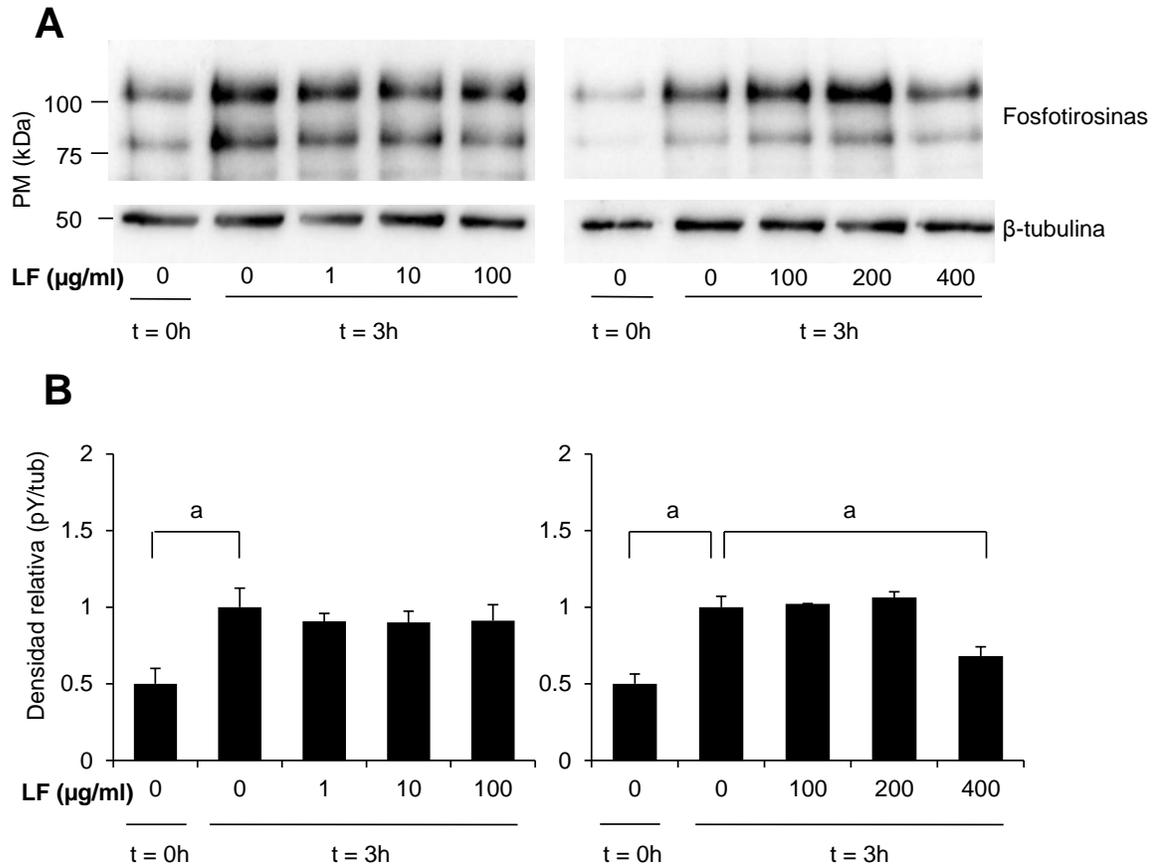


Fig. 6.9. Efecto de lactoferrina (LF) sobre la fosforilación en tirosinas de proteínas espermáticas. (A) Western blots representativos de la fosforilación de tirosinas. (B) Análisis densitométrico de la abundancia de fosfotirosinas, normalizado por la señal de tubulina (pY/tub). Se muestran las medias + EE. $n=5$. (a) $p < 0.05$.

En cuanto al efecto de la lactoferrina sobre la reacción acrosomal, en la figura 6.10 se observa que la reacción acrosomal espontánea no mostró cambios con ninguna de las concentraciones empleadas, lo que indica que de manera basal la lactoferrina no promueve este proceso. Por su parte, la reacción acrosomal inducida por Cal es mayor a la espontánea en los controles al tiempo 0 y a las 3 horas de incubación, lo que indica que los espermatozoides están capacitados. Esta diferencia se mantiene a concentraciones de 1, 10 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de lactoferrina. Sin embargo, se observó

que a concentraciones de 200 y 400 $\mu\text{g/ml}$ hubo una disminución en el porcentaje de espermatozoides con reacción acrosomal inducida por Cal en comparación con el grupo de 3 horas y en ausencia de lactoferrina, lo que indica que esta proteína interviene de manera negativa en la capacitación del espermatozoide. Estos resultados concuerdan con lo mostrado en el apartado anterior en donde se observa una disminución en la fosforilación de tirosinas en presencia de lactoferrina a 400 $\mu\text{g/ml}$.

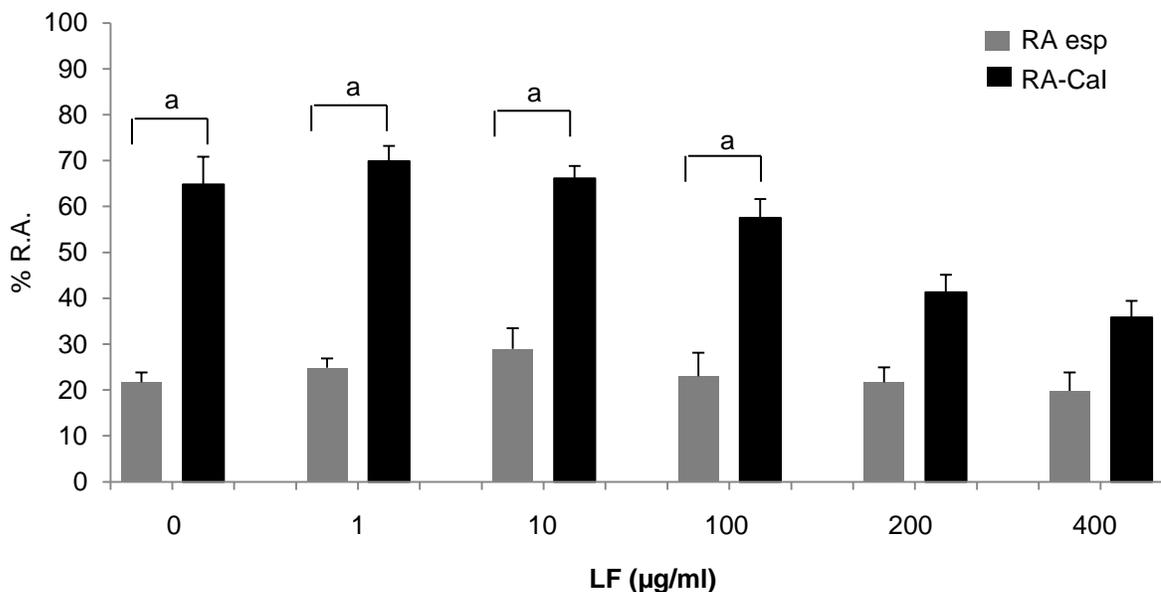


Fig. 6.10. Efecto de lactoferrina (LF) sobre la reacción acrosomal espontánea (RA esp) e inducida por ionóforo de calcio (RA-Cal). $t=3\text{h}$. $n=8$. Se muestran las medias + EE. (a) $p<0.05$.

6.7. Unión de la lactoferrina al espermatozoide

Debido a que observamos que la lactoferrina interfiere con la capacitación, se identificaron los sitios de unión de esta proteína al espermatozoide por medio de inmunofluorescencia, en donde se observa que esta proteína se une a la pieza media y cola de los espermatozoides (Fig. 6.11).

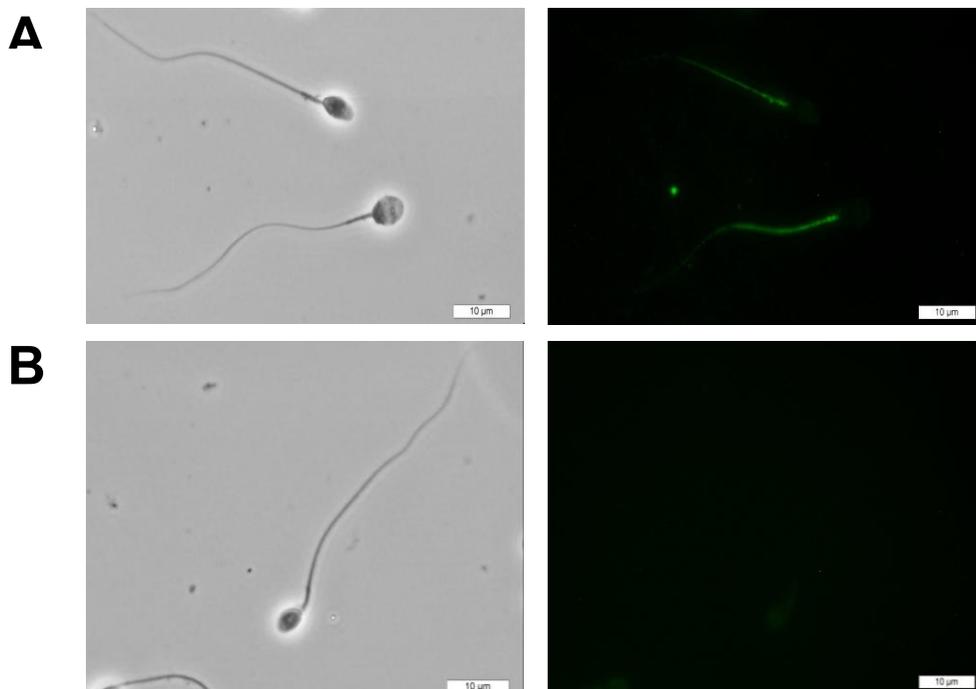


Fig. 6.11. Distribución de lactoferrina en espermatozoides. Los espermatozoides se incubaron 3h con lactoferrina [400 µg/ml]. (A) Espermatozoides incubados con anticuerpo anti-LF. (B) Control negativo en ausencia de anticuerpo anti-LF. Panel izquierdo: Contraste de fases; Panel derecho: Inmunofluorescencia. Aumento: 1000x.

6.8. Presencia de glicodelina A en lavados uterinos

Debido a que estudios previos han mostrado que una de las proteínas que aumenta con el tratamiento con el levonorgestrel es la glicodelina A [21], se procedió a la identificación de esta proteína en los lavados uterinos. Para ello, las proteínas se separaron por medio de SDS-PAGE y se identificaron por Western blot.

En la figura 6.12.A se observan las proteínas de los lavados uterinos separadas mediante SDS-PAGE, donde se muestra una carga similar de proteínas entre los diferentes grupos de estudio. Al analizar las mismas proteínas mediante Western blot utilizando el anticuerpo anti-GdA (Fig. 6.12.B) se observa la detección de una banda con un peso molecular de aproximadamente 26 kDa en el lavado uterino tratado con levonorgestrel. Sin embargo, la glicodelina A pura muestra un peso molecular aproximado de 21 kDa debido a que esta proteína es recombinante

expresada en bacterias y no cuenta con las glicosilaciones características de la glicodelina A lo que modifica su movilidad y peso en los geles lo cual explica la diferencia observada en los pesos moleculares. El anticuerpo también reconoció en ambos lavados uterinos una banda de 50 kDa y en menor medida otra de aproximadamente 70 kDa, cuyas identidades se desconocen.

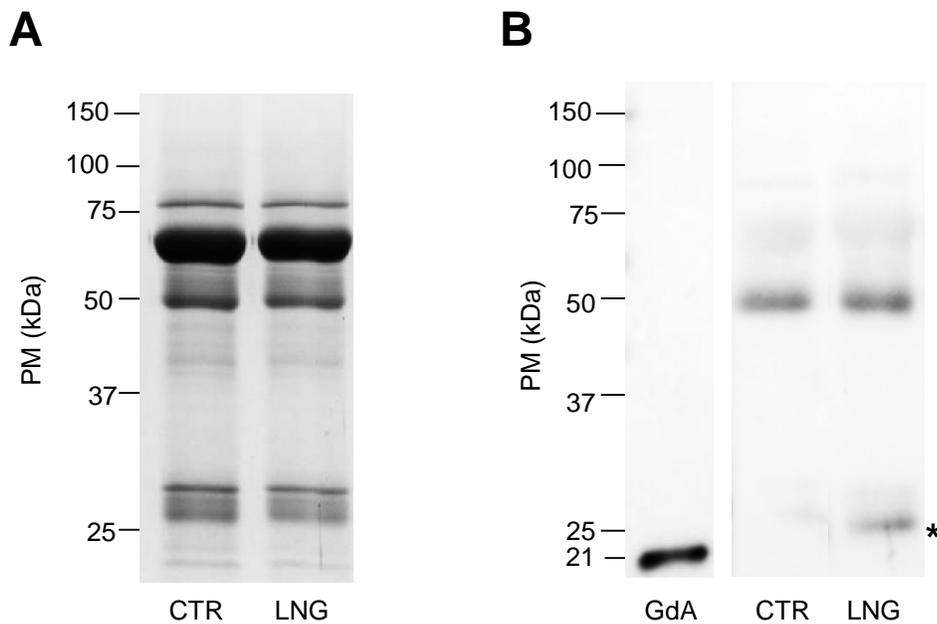


Fig. 6.12. Identificación de glicodelina A en secreciones endometriales mediante SDS-PAGE. (A) SDS-PAGE de lavados uterinos CTR y LNG. (B) Western blot con anticuerpo anti-GdA de lavados uterinos CTR y LNG. Control positivo: glicodelina A pura (GdA). (*) = peso molecular esperado para la glicodelina A. CTR= control, LNG= tratado con levonorgestrel.

Adicionalmente, las proteínas de los lavados uterinos se separaron mediante 2-DE (Fig. 6.13.A) y se analizaron mediante Western blot (Fig. 6.13.B) observándose dos grupos de manchas de pesos moleculares aproximados de 26 kDa y de 48 kDa con diferentes puntos isoeléctricos. Cabe destacar que el anticuerpo también reconoció unas bandas de aproximadamente 85 kDa, mismas que no se observaron en el SDS-PAGE, probablemente debido a que no hubo una buena desnaturalización de las proteínas, por lo que corresponderían a dímeros de la glicodelina A.

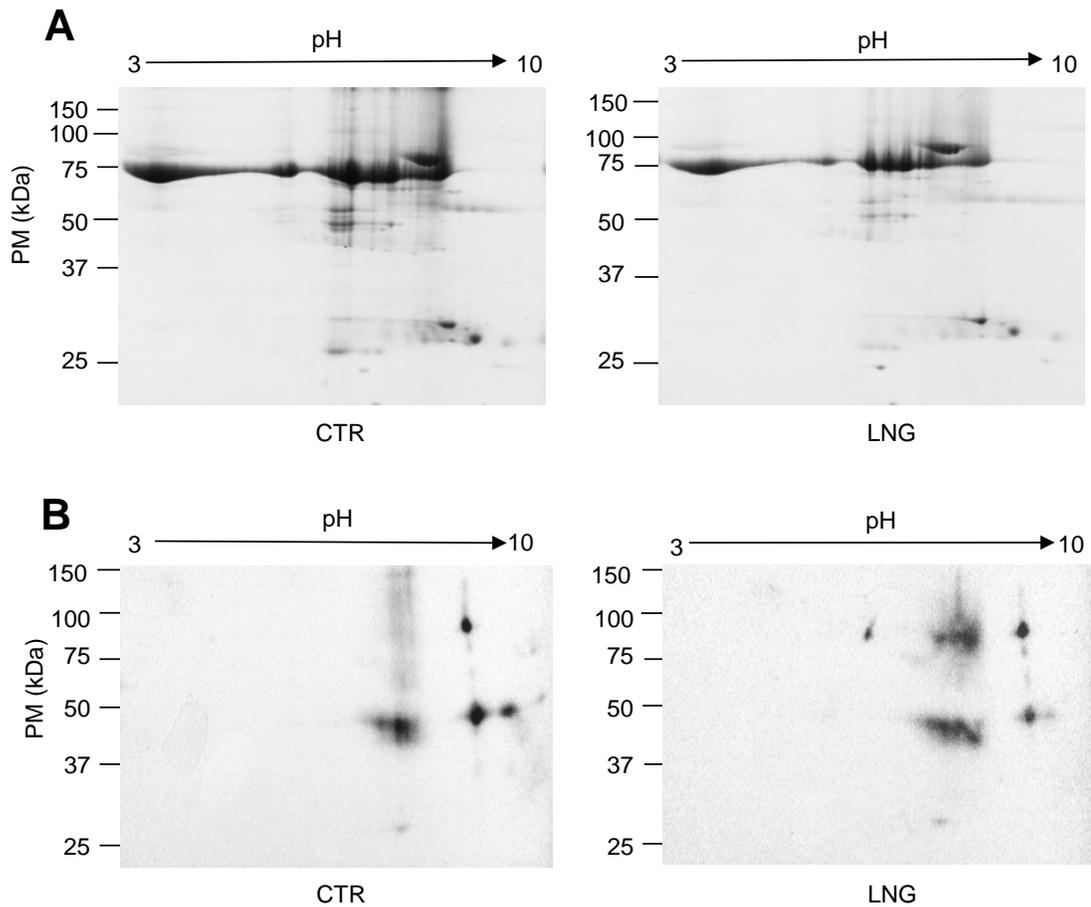


Fig. 6.13. Identificación de glicodelina A en secreciones endometriales mediante geles bidimensionales. (A) Geles bidimensionales de lavados uterinos CTR y LNG. (B) Western Blot con anticuerpo anti-GdA de lavados uterinos CTR y LNG. CTR= control, LNG= tratado con levonorgestrel.

6.9. Efecto de la glicodelina A sobre la función espermática

Debido a que el patrón de secreción de la glicodelina A cambia con el levonorgestrel, se evaluó su posible participación en algunos parámetros funcionales de los espermatozoides. En la figura 6.14 se muestra que el porcentaje de espermatozoides móviles no se modifica luego de incubar 3 horas a diferentes concentraciones de glicodelina A en comparación con su grupo control.

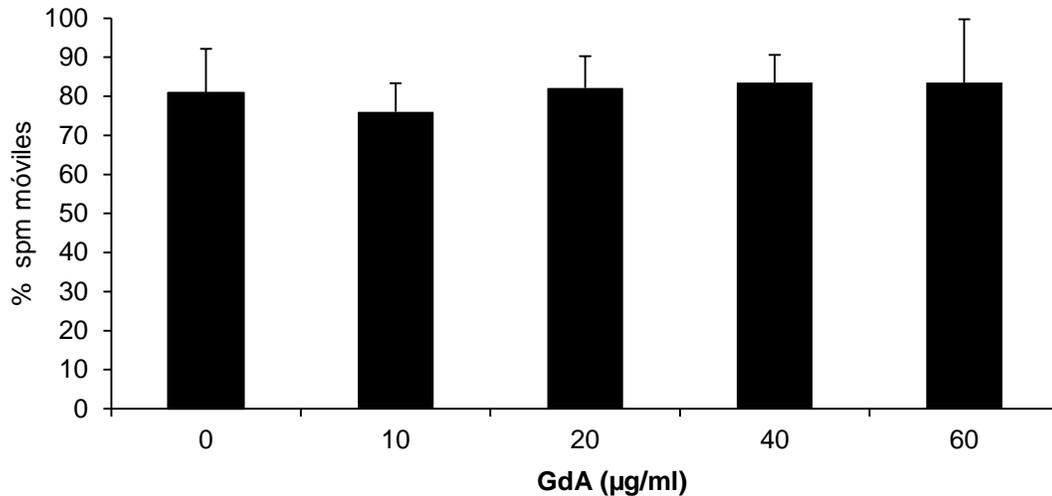


Fig. 6.14. Efecto de glicodelina A (GdA) sobre la movilidad de espermatozoides. t=3h. n=7. Se muestran las medias + EE. No se observaron diferencias significativas entre los grupos.

En la figura 6.15 se muestra el efecto de la glicodelina A en la fosforilación de tirosinas. Tanto en el Western blot representativo (Fig. 6.15.A) como en la densitometría a partir de tres experimentos (Fig. 6.15.B) se puede observar que en ausencia de glicodelina A la fosforilación a las 3 horas de incubación es mayor que al tiempo 0. Por su parte, las diferentes concentraciones de glicodelina A probadas no alteraron el patrón ni la abundancia de la fosforilación de tirosinas de las proteínas.

En cuanto a la reacción acrosomal, en la figura 6.16 se muestra que la reacción acrosomal espontánea no cambia con ninguna de las concentraciones de glicodelina A evaluadas. Por otra parte, la reacción acrosomal inducida por Cal es mayor a la espontánea en el control correspondiente en todas las condiciones evaluadas, lo que indica que la glicodelina A no afecta este proceso.

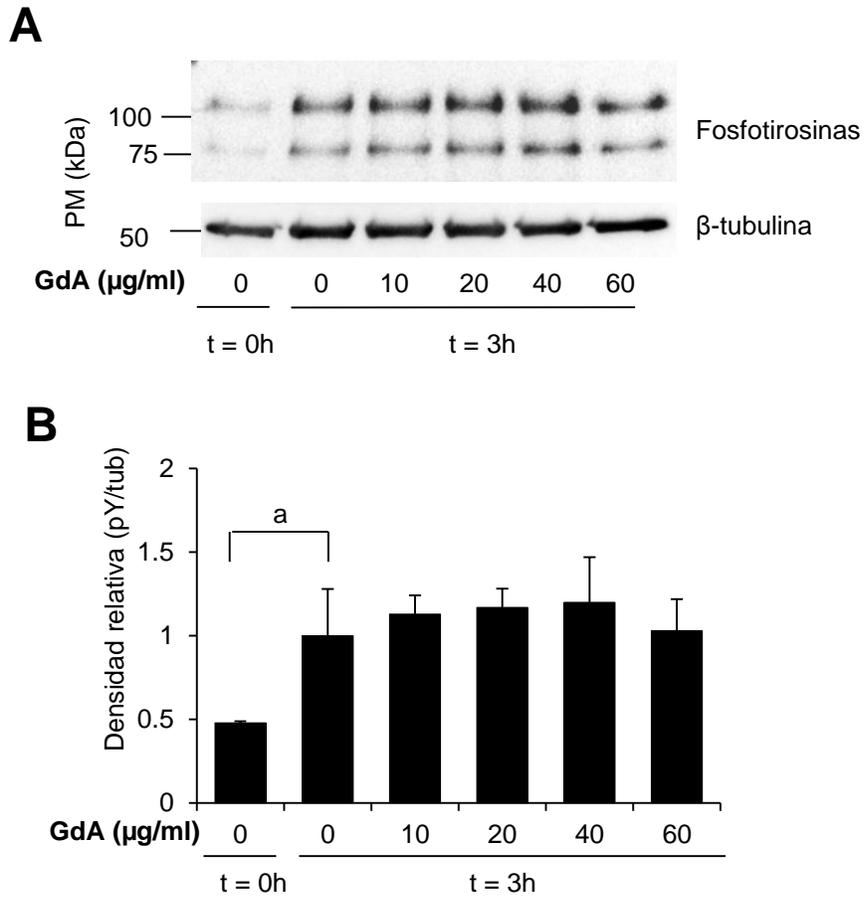


Fig. 6.15. Efecto de glicodelina A (GdA) sobre la fosforilación en tirosinas de proteínas espermáticas. (A) Western blot representativo de la fosforilación de tirosinas. (B) Análisis densitométrico de la abundancia de fosfotirosinas, normalizado por la señal de tubulina (pY/tub). Se muestran las medias + EE. n=3. (a) $p < 0.05$.

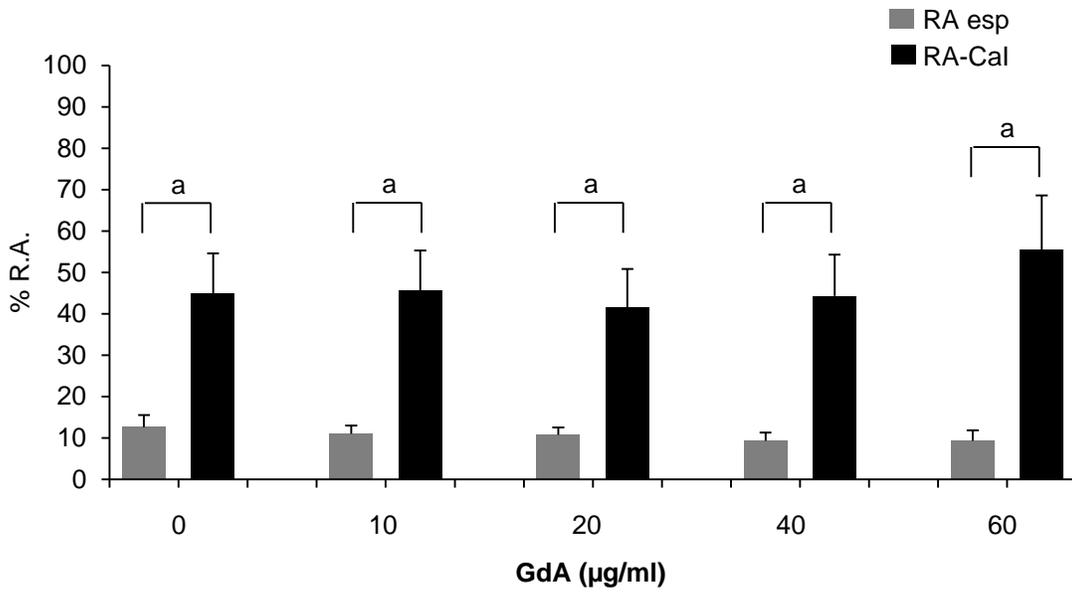


Fig. 6.16. Efecto de glicodelina A (GdA) sobre la reacción acrosomal espontánea (RA esp) e inducida por ionóforo de calcio (RA-Cal), t=3h, n=7. Se muestran las medias + EE. (a) p<0.05.

7. DISCUSIÓN

El levonorgestrel como anticonceptivo de emergencia es frecuentemente utilizado por su alta efectividad para prevenir embarazos no deseados, aunque su mecanismo de acción no se ha dilucidado completamente. Existe evidencia de que esta progestina puede modificar el patrón de secreción de proteínas endometriales [21], por lo que se ha sugerido que las proteínas secretadas podrían ser mediadores de sus efectos anticonceptivos, principalmente en la regulación de la capacidad fecundante del espermatozoide.

Debido a que la mayoría de las proteínas de secreción se encuentran glicosiladas [78] y que su actividad biológica depende de los carbohidratos que las componen, los cambios observados en el patrón de glicosilación de las proteínas con el tratamiento con levonorgestrel podrían tener implicaciones en la actividad biológica de las proteínas. A este respecto, se ha mostrado que la glicodelina A y F son abundantes en ácidos siálicos y manosas, los cuales se unen al espermatozoide y así inhiben su interacción con la zona pelúcida. Cuando estas glicoproteínas son desglicosiladas pierden la capacidad de afectar esta interacción, lo que sugiere que los carbohidratos son importantes para las funciones biológicas de las proteínas [80, 81].

Las proteínas endometriales secretadas durante la ovulación podrían ser importantes para que el espermatozoide adquiriera la habilidad de fecundar al ovocito. En este estudio se observó que el tratamiento con levonorgestrel disminuyó la abundancia de la mayoría de las proteínas secretadas por el endometrio. Una de las proteínas que disminuyó con el levonorgestrel fue la albúmina (o algunas de sus variantes), la cual es fundamental en el proceso de capacitación al remover las moléculas de colesterol que se encuentran en la cabeza de los espermatozoides [32]. Por lo tanto, es posible que la disminución de la albúmina en las secreciones uterinas derivadas del tratamiento tenga implicaciones importantes para la fecundación.

Otra proteína que disminuyó con el tratamiento fue el precursor de serotransferrina. Una proteína que pertenece a la familia de las serotransferrinas es la lactoferrina, la cual está presente en los lavados uterinos y mostró un aumento con el levonorgestrel. Esta proteína se ha descrito en las secreciones del oviducto [68] y en el semen [82]. En el presente trabajo observamos la presencia de lactoferrina en secreciones obtenidas del útero, lo que sugiere que las células endometriales también son capaces de secretar esta proteína, o bien la lactoferrina secretada en el oviducto difunde hasta el útero. En cuanto a esto, estudios previos han mostrado por medio de inmunohistoquímica la presencia de lactoferrina en tejido endometrial en las diferentes fases del ciclo menstrual [83, 84], lo cual sugiere su posible secreción por estas células.

Por otra parte, en este trabajo observamos que la lactoferrina se une a la pieza media y al flagelo del espermatozoide, lo cual nos permite pensar que la lactoferrina podría ejercer algún efecto biológico en el gameto. Este resultado concuerda con lo observado por Wang y colaboradores [85], quienes mostraron que la lactoferrina se une al flagelo cuando transita por el tracto reproductor masculino. Por otra parte, se ha mostrado la presencia de un receptor a lactoferrina en el espermatozoide, el cual se transcribe y sintetiza a nivel testicular y se encuentra anclado a la membrana plasmática de la cabeza y pieza media [86], mismo que podría mediar los efectos biológicos de la lactoferrina sobre el gameto.

La concentración de lactoferrina en lavados uterinos es desconocida. Sin embargo para evaluar los posibles efectos biológicos de esta proteína sobre la función espermática se utilizaron concentraciones en las que se ha demostrado que es capaz de inhibir la interacción del espermatozoide con la zona pelúcida [68] y otras superiores, observándose que fue capaz de disminuir la fosforilación en tirosinas de proteínas espermáticas, así como la reacción acrosomal inducida por Cal. Es posible sugerir que la lactoferrina al interactuar con la pieza media y el flagelo del espermatozoide interfiera con las vías de señalización asociadas a la fosforilación de proteínas. En cuanto a esto, existe evidencia que indica que la lactoferrina es

capaz de modular la fosforilación en diferentes modelos celulares. Xiao y colaboradores [87] mostraron que la incubación de lactoferrina con células de cáncer disminuye la fosforilación de la proteína cinasa B, necesaria para el crecimiento celular. Los autores sugieren que este efecto podría estar modulado por la disminución en la fosforilación de algunas proteínas. Por otra parte, se ha mostrado que la incubación de células de hepatocarcinoma con diferentes concentraciones de lactoferrina incrementa de manera dosis-dependiente la fosforilación de la serina 473 de la proteína cinasa B y de la treonina 172 de la proteína cinasa activada por AMP [88]. Los efectos contradictorios de la lactoferrina sobre la fosforilación posiblemente sean el resultado de utilizar diferentes modelos celulares, a pesar de lo cual parece razonable postular una vía de señalización donde la lactoferrina provoque cambios en la fosforilación de proteínas. Por otra parte, ya que sólo los espermatozoides capacitados pueden responder al Cal para inducir la reacción acrosomal [52], nuestros resultados sobre una disminución en la reacción acrosomal inducida en células expuestas a lactoferrina sugieren que la lactoferrina podría intervenir en el proceso de la fecundación mediante una modulación negativa de la capacitación espermática.

En cuanto a la glicodelina A, nosotros observamos un aumento de esta proteína en lavados uterinos por el tratamiento con levonorgestrel, lo cual coincide con trabajos previos [21]. Dado que secreción de glicodelina A es regulada por la progesterona, la presencia de levonorgestrel en la fase periovulatoria (carente de progesterona) podría ser la causante del aumento en la secreción endometrial de esta proteína. La detección de proteínas de mayor peso molecular (50 kDa) en la identificación de glicodelina A en los lavados uterinos sugiere que esta proteína podría estar formando dímeros, ya que se ha reportado que a pH 7 la glicodelina A forma dímeros estables con una conformación beta de hoja plegada [89].

Investigaciones previas han demostrado que la glicodelina A puede inhibir la interacción del espermatozoide con la zona pelúcida [67]. Sin embargo, sus posibles efectos sobre otras variables de función espermática no se habían estudiado. En el

presente trabajo mostramos evidencias de que la glicodelina A no tiene efecto sobre la movilidad, la fosforilación de tirosinas ni la reacción acrosomal espontánea e inducida por Cal. Estudios previos han mostrado que esta proteína se une al gameto a través de la fucosiltransferasa que se localiza en su membrana plasmática [90], por lo que se puede sugerir que la actividad anticonceptiva de la glicodelina A podría deberse al bloqueo de la interacción de gametos [67].

Una proteína que disminuyó por acción del levonorgestrel fue la proteína HP. Estudios previos han mostrado que el gen HP codifica para una proteína que forma la haptoglobina [91]. Esta es una proteína que se une a la hemoglobina plasmática libre para promover su degradación [92]. Se ha involucrado a este gen en algunas patologías como la nefropatía diabética o con procesos inflamatorios como la endometriosis [93]. Estudios previos ya han mostrado la presencia de esta proteína en secreciones del oviducto durante la fase secretora [94], pero su posible participación en procesos reproductivos no ha sido evaluada.

Los resultados de este trabajo contribuyen al entendimiento de uno de los mecanismos de acción del levonorgestrel como anticonceptivo de emergencia, favoreciendo que las potenciales usuarias puedan tomar decisiones sobre su uso basadas en evidencias. Adicionalmente, la identificación de lactoferrina como una proteína moduladora negativa de la capacidad fecundante del espermatozoide abre la puerta a nuevas aplicaciones que aprovechen sus propiedades anticonceptivas.

8. CONCLUSIONES

- El tratamiento con levonorgestrel indujo cambios en la abundancia relativa de algunas proteínas en los lavados uterinos de mujeres, destacando el aumento de 8 proteínas y la disminución de 26.
- Una de las proteínas que aumentó con el tratamiento con el levonorgestrel fue la lactoferrina. Esta proteína inhibió la fosforilación de tirosinas y la reacción acrosomal inducida por ionóforo de calcio. Esto sugiere que la lactoferrina podría ser parcialmente responsable del efecto anticonceptivo del levonorgestrel por medio de sus efectos sobre la capacidad fecundante del espermatozoide.
- Otra proteína que aumenta en los lavados uterinos por efecto del levonorgestrel es la glicodelina A. Sin embargo, no tuvo efectos sobre la movilidad, la capacitación y la reacción acrosomal espontánea e inducida por ionóforo de calcio.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. UNDP U, WHO, World Bank, Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction. . Levonorgestrel for emergency contraception. In, vol. 2005: Fact Sheet 2014.
2. Ellertson C. History and efficacy of emergency contraception: beyond Coca-Cola. *Fam Plann Perspect* 1996; 28: 44-48.
3. Haspels AA. Interception: post-coital estrogens in 3016 women. *Contraception* 1976; 14: 375-381.
4. Yuzpe AA, Thurlow HJ, Ramzy I, Leyshon JI. Post coital contraception--A pilot study. *J Reprod Med* 1974; 13: 53-58.
5. Kesserü E, Larranaga, A., Parada, J. Postcoital contraception with D-Norgestrel. *Contraception* 1973; 7: 367-379.
6. Task Force on Postovulatory Methods of Fertility Regulation. Randomised controlled trial of levonorgestrel versus the Yuzpe regimen of combined oral contraceptives for emergency contraception. *Lancet* 1998; 352: 428-433.
7. Kloosterboer HJ, Vonk-Noordegraaf CA, Turpijn EW. Selectivity in progesterone and androgen receptor binding of progestagens used in oral contraceptives. *Contraception* 1988; 38: 325-332.
8. Garcia-Becerra R, Borja-Cacho E, Cooney AJ, Jackson KJ, Lemus AE, Perez-Palacios G, Larrea F. The intrinsic transcriptional estrogenic activity of a non-phenolic derivative of levonorgestrel is mediated via the estrogen receptor-alpha. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 82: 333-341.
9. Rabe T, Bohlmann MK, Rehberger-Schneider S, Prifti S. Induction of estrogen receptor-alpha and -beta activities by synthetic progestins. *Gynecol Endocrinol* 2000; 14: 118-126.
10. Hidalgo M, Bahamondes L, Perrotti M, Diaz J, Dantas-Monteiro C, Petta C. Bleeding patterns and clinical performance of the levonorgestrel-releasing intrauterine system (Mirena) up to two years. *Contraception* 2002; 65: 129-132.
11. Coukell AJ, Balfour JA. Levonorgestrel subdermal implants. A review of contraceptive efficacy and acceptability. *Drugs* 1998; 55: 861-887.
12. Croxatto HB, Ortiz ME, Muller AL. Mechanisms of action of emergency contraception. *Steroids* 2003; 68: 1095-1098.
13. Piaggio G, von Hertzen H, Grimes DA, Van Look PF. Timing of emergency contraception with levonorgestrel or the Yuzpe regimen. Task Force on Postovulatory Methods of Fertility Regulation. *Lancet* 1999; 353: 721.
14. Durand M, del Carmen Cravioto M, Raymond EG, Duran-Sanchez O, De la Luz Cruz-Hinojosa M, Castell-Rodriguez A, Schiavon R, Larrea F. On the mechanisms of action of short-term levonorgestrel administration in emergency contraception. *Contraception* 2001; 64: 227-234.

15. Kesseru E, Garmendia F, Westphal N, Parada J. The hormonal and peripheral effects of d-norgestrel in postcoital contraception. *Contraception* 1974; 10: 411-424.
16. Lalitkumar PG, Lalitkumar S, Meng CX, Stavreus-Evers A, Hambiliki F, Bentin-Ley U, Gemzell-Danielsson K. Mifepristone, but not levonorgestrel, inhibits human blastocyst attachment to an in vitro endometrial three-dimensional cell culture model. *Hum Reprod* 2007; 22: 3031-3037.
17. Ortiz ME, Ortiz RE, Fuentes MA, Parraguez VH, Croxatto HB. Post-coital administration of levonorgestrel does not interfere with post-fertilization events in the new-world monkey *Cebus apella*. *Hum Reprod* 2004; 19: 1352-1356.
18. Yeung WS, Chiu PC, Wang CH, Yao YQ, Ho PC. The effects of levonorgestrel on various sperm functions. *Contraception* 2002; 66: 453-457.
19. Bahamondes L, Nascimento JA, Munuce MJ, Fazano F, Faundes A. The in vitro effect of levonorgestrel on the acrosome reaction of human spermatozoa from fertile men. *Contraception* 2003; 68: 55-59.
20. Landgren BM, Johannisson E, Aedo AR, Kumar A, Shi YE. The effect of levonorgestrel administered in large doses at different stages of the cycle on ovarian function and endometrial morphology. *Contraception* 1989; 39: 275-289.
21. Durand M, Koistinen R, Chirinos M, Rodriguez JL, Zambrano E, Seppala M, Larrea F. Hormonal evaluation and midcycle detection of intrauterine glycodeclin in women treated with levonorgestrel as in emergency contraception. *Contraception* 2010; 82: 526-533.
22. Cornillie FJ, Lauweryns JM, Brosens IA. Normal human endometrium. An ultrastructural survey. *Gynecol Obstet Invest* 1985; 20: 113-129.
23. Verma V. Ultrastructural changes in human endometrium at different phases of the menstrual cycle and their functional significance. *Gynecol Obstet Invest* 1983; 15: 193-212.
24. Slader TW. Lagman. *Fundamentos de embriología médica con orientación clínica*. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.
25. Salamonsen LAE, T.; Rombauts, L.J.F.; Stephens, A.N.; Robertson, D.M.; Rainczuk, A.; Nie, G.; Hannan, N.J. Proteomics of the human endometrium and uterine fluid: a pathway to biomarker discovery. *Fertility and Sterility* 2013; 99: 1086 - 1092.
26. Aguilar J. The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects. *Animal Reproduction* 2005; 2: 91-105.
27. Leese HJ. The formation and function of oviduct fluid. *J Reprod Fertil* 1988; 82: 843-856.
28. Hugentobler SA, Morris DG, Sreenan JM, Diskin MG. Ion concentrations in oviduct and uterine fluid and blood serum during the estrous cycle in the bovine. *Theriogenology* 2007; 68: 538-548.

29. Casslen B, Nilsson B. Human uterine fluid, examined in undiluted samples for osmolarity and the concentrations of inorganic ions, albumin, glucose, and urea. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 150: 877-881.
30. Casslen BG. Free amino acids in human uterine fluid. Possible role of high taurine concentration. *J Reprod Med* 1987; 32: 181-184.
31. Chen JI, Hannan NJ, Mak Y, Nicholls PK, Zhang J, Rainczuk A, Stanton PG, Robertson DM, Salamonsen LA, Stephens AN. Proteomic characterization of midproliferative and midsecretory human endometrium. *J Proteome Res* 2009; 8: 2032-2044.
32. Go KJ, Wolf DP. Albumin-mediated changes in sperm sterol content during capacitation. *Biol Reprod* 1985; 32: 145-153.
33. Tabibzadeh S, Broome J. Heat shock proteins in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999; 7: 5-9.
34. Eddy EM. *Physiology of Reproduction*. New York: Academic Press Elsevier; 2006.
35. O'Donnell L, O'Bryan MK. Microtubules and spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 30: 45-54.
36. De Jonge C. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update* 2005; 11: 205-214.
37. Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-Clarke P, Kopf GS. Capacitation of mouse spermatozoa. I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* 1995; 121: 1129-1137.
38. Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest* 2010; 120: 984-994.
39. Costello S, Michelangeli F, Nash K, Lefievre L, Morris J, Machado-Oliveira G, Barratt C, Kirkman-Brown J, Publicover S. Ca²⁺-stores in sperm: their identities and functions. *Reproduction* 2009; 138: 425-437.
40. Visconti PE. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 667-668.
41. Turner RM, Eriksson RL, Gerton GL, Moss SB. Relationship between sperm motility and the processing and tyrosine phosphorylation of two human sperm fibrous sheath proteins, pro-hAKAP82 and hAKAP82. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 816-824.
42. Carrera A, Moos J, Ning XP, Gerton GL, Tesarik J, Kopf GS, Moss SB. Regulation of protein tyrosine phosphorylation in human sperm by a calcium/calmodulin-dependent mechanism: identification of A kinase anchor proteins as major substrates for tyrosine phosphorylation. *Dev Biol* 1996; 180: 284-296.
43. Luconi M, Carloni V, Marra F, Ferruzzi P, Forti G, Baldi E. Increased phosphorylation of AKAP by inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase

- enhances human sperm motility through tail recruitment of protein kinase A. *J Cell Sci* 2004; 117: 1235-1246.
44. Naz RK. Involvement of protein serine and threonine phosphorylation in human sperm capacitation. *Biol Reprod* 1999; 60: 1402-1409.
 45. Sagare-Patil V, Vernekar M, Galvankar M, Modi D. Progesterone utilizes the PI3K-AKT pathway in human spermatozoa to regulate motility and hyperactivation but not acrosome reaction. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 374: 82-91.
 46. Abou-haila A, Tulsiani DR. Signal transduction pathways that regulate sperm capacitation and the acrosome reaction. *Arch Biochem Biophys* 2009; 485: 72-81.
 47. Hall J, Guyton, A. *Tratado de fisiología médica*. España: Elsevier; 2011.
 48. Osman RA, Andria ML, Jones AD, Meizel S. Steroid induced exocytosis: the human sperm acrosome reaction. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160: 828-833.
 49. Ganguly A, Bukovsky A, Sharma RK, Bansal P, Bhandari B, Gupta SK. In humans, zona pellucida glycoprotein-1 binds to spermatozoa and induces acrosomal exocytosis. *Hum Reprod* 2010; 25: 1643-1656.
 50. Caballero-Campo P, Chirinos M, Fan XJ, Gonzalez-Gonzalez ME, Galicia-Chavarría M, Larrea F, Gerton GL. Biological effects of recombinant human zona pellucida proteins on sperm function. *Biol Reprod* 2006; 74: 760-768.
 51. Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL, Hartmann PE. A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other seminal parameters. *J Androl* 1991; 12: 98-103.
 52. Picherit-Marchenay C, Brechard S, Boucher D, Grizard G. Correlation between tyrosine phosphorylation intensity of a 107 kDa protein band and A23187-induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Andrologia* 2004; 36: 370-377.
 53. Gerton GL. Function of the sperm acrosome. *Fertilization* 2002: 265-302.
 54. Bleil JD, Greve JM, Wassarman PM. Identification of a secondary sperm receptor in the mouse egg zona pellucida: role in maintenance of binding of acrosome-reacted sperm to eggs. *Dev Biol* 1988; 128: 376-385.
 55. Luconi M, Bonaccorsi L, Maggi M, Pecchioli P, Krausz C, Forti G, Baldi E. Identification and characterization of functional nongenomic progesterone receptors on human sperm membrane. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 877-885.
 56. Solakidi S, Psarra AM, Nikolaropoulos S, Sekeris CE. Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum Reprod* 2005; 20: 3481-3487.

57. Rauch MC, Brito M, Zambrano A, Espinoza M, Perez M, Yanez A, Rivas CI, Slebe JC, Vera JC, Concha, II. Differential signalling for enhanced hexose uptake by interleukin (IL)-3 and IL-5 in male germ cells. *Biochem J* 2004; 381: 495-501.
58. Feki NC, Therond P, Couturier M, Limea G, Legrand A, Jouannet P, Auger J. Human sperm lipid content is modified after migration into human cervical mucus. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 137-142.
59. Laflamme J, Akoum A, Leclerc P. Induction of human sperm capacitation and protein tyrosine phosphorylation by endometrial cells and interleukin-6. *Mol Hum Reprod* 2005; 11: 141-150.
60. Banerjee M, Chowdhury M. Localization of a 25 kDa human sperm surface protein: its role in in-vitro human sperm capacitation. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 109-114.
61. Huang VW, Zhao W, Lee CL, Lee CY, Lam KK, Ko JK, Yeung WS, Ho PC, Chiu PC. Cell membrane proteins from oviductal epithelial cell line protect human spermatozoa from oxidative damage. *Fertil Steril* 2013; 99: 1444-1452 e1443.
62. Yeung WS, Ng VK, Lau EY, Ho PC. Human oviductal cells and their conditioned medium maintain the motility and hyperactivation of human spermatozoa in vitro. *Hum Reprod* 1994; 9: 656-660.
63. Kervancioglu ME, Djahanbakhch O, Aitken RJ. Epithelial cell coculture and the induction of sperm capacitation. *Fertil Steril* 1994; 61: 1103-1108.
64. Zumoffen CM, Caille AM, Munuce MJ, Cabada MO, Ghersevich SA. Proteins from human oviductal tissue-conditioned medium modulate sperm capacitation. *Hum Reprod* 2010; 25: 1504-1512.
65. Lachance C, Bailey JL, Leclerc P. Expression of Hsp60 and Grp78 in the human endometrium and oviduct, and their effect on sperm functions. *Hum Reprod* 2007; 22: 2606-2614.
66. Marin-Briggiler CI, Gonzalez-Echeverria MF, Munuce MJ, Ghersevich S, Caille AM, Hellman U, Corrigan VM, Vazquez-Levin MH. Glucose-regulated protein 78 (Grp78/BiP) is secreted by human oviduct epithelial cells and the recombinant protein modulates sperm-zona pellucida binding. *Fertil Steril* 2010; 93: 1574-1584.
67. Oehninger S, Coddington CC, Hodgen GD, Seppala M. Factors affecting fertilization: endometrial placental protein 14 reduces the capacity of human spermatozoa to bind to the human zona pellucida. *Fertil Steril* 1995; 63: 377-383.
68. Zumoffen CM, Gil R, Caille AM, Morente C, Munuce MJ, Ghersevich SA. A protein isolated from human oviductal tissue in vitro secretion, identified as human lactoferrin, interacts with spermatozoa and oocytes and modulates gamete interaction. *Hum Reprod* 2013; 28: 1297-1308.

69. Flower DR. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem J* 1996; 318 (Pt 1): 1-14.
70. Bolton AE, Pockley AG, Clough KJ, Mowles EA, Stoker RJ, Westwood OM, Chapman MG. Identification of placental protein 14 as an immunosuppressive factor in human reproduction. *Lancet* 1987; 1: 593-595.
71. Seppala M, Koistinen H, Koistinen R, Chiu PC, Yeung WS. Glycosylation related actions of glycodelin: gamete, cumulus cell, immune cell and clinical associations. *Hum Reprod Update* 2007; 13: 275-287.
72. Anderson BF, Baker HM, Norris GE, Rice DW, Baker EN. Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol* 1989; 209: 711-734.
73. Lonnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr* 1995; 15: 93-110.
74. Teng CT, Gladwell W, Beard C, Walmer D, Teng CS, Brenner R. Lactoferrin gene expression is estrogen responsive in human and rhesus monkey endometrium. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 58-67.
75. Chirinos M, Carino C, Gonzalez-Gonzalez ME, Arreola E, Reveles R, Larrea F. Characterization of human sperm binding to homologous recombinant zona pellucida proteins. *Reprod Sci* 2011; 18: 876-885.
76. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge, U.K. ; New York, NY: Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press; 1999.
77. Cross NLM, P.; Overstreet, J.W. Hanson, F.W. Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Res* 1986; 15: 213-226.
78. Alberts BB, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J.D. *Biología molecular de la célula*. Barcelona: Omega; 2002.
79. Chiu PC, Chung MK, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Ho PC, Ng EH, Lee KF, Yeung WS. Cumulus oophorus-associated glycodelin-C displaces sperm-bound glycodelin-A and -F and stimulates spermatozoa-zona pellucida binding. *J Biol Chem* 2007; 282: 5378-5388.
80. Dell A, Morris HR, Easton RL, Panico M, Patankar M, Oehniger S, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Clark GF. Structural analysis of the oligosaccharides derived from glycodelin, a human glycoprotein with potent immunosuppressive and contraceptive activities. *J Biol Chem* 1995; 270: 24116-24126.
81. Chiu PC, Tsang HY, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Lee KF, Yeung WS. The contribution of D-mannose, L-fucose, N-acetylglucosamine, and selectin residues on the binding of glycodelin isoforms to human spermatozoa. *Biol Reprod* 2004; 70: 1710-1719.

82. Tauber PF, Zaneveld LJ, Propping D, Schumacher GF. Components of human split ejaculates. I. Spermatozoa, fructose, immunoglobulins, albumin, lactoferrin, transferrin and other plasma proteins. *J Reprod Fertil* 1975; 43: 249-267.
83. Kelder ME, Kaul A, Nowicki B, Findley WE, Hutchens TW, Nagamani M. Estrogen regulation of lactoferrin expression in human endometrium. *Am J Reprod Immunol* 1996; 36: 243-247.
84. Masson PL, Heremans JF, Ferin J. Presence of an Iron-binding protein (lactoferrin) in the genital tract of the human female. I. Its immunohistochemical localization in the endometrium. *Fertil Steril* 1968; 19: 679-689.
85. Wang Z, Widgren EE, Richardson RT, O'Rand MG. Characterization of an eppin protein complex from human semen and spermatozoa. *Biol Reprod* 2007; 77: 476-484.
86. Wang P, Liu B, Wang Z, Niu X, Su S, Zhang W, Wang X. Characterization of lactoferrin receptor on human spermatozoa. *Reprod Biomed Online* 2012; 22: 155-161.
87. Xiao Y, Monitto CL, Minhas KM, Sidransky D. Lactoferrin down-regulates G1 cyclin-dependent kinases during growth arrest of head and neck cancer cells. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8683-8686.
88. Moreno-Navarrete JM, Ortega FJ, Ricart W, Fernandez-Real JM. Lactoferrin increases (172Thr)AMPK phosphorylation and insulin-induced (p473Ser)AKT while impairing adipocyte differentiation. *Int J Obes (Lond)* 2009; 33: 991-1000.
89. Barteri M, Gaudio MC, Rotella S, Benaglio G, Pala A. Effect of pH on the structure and aggregation of human glycodelin A. A comparison with beta-lactoglobulin A. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1479: 255-264.
90. Chiu PC, Chung MK, Koistinen R, Koistinen H, Seppala M, Ho PC, Ng EH, Lee KF, Yeung WS. Glycodelin-A interacts with fucosyltransferase on human sperm plasma membrane to inhibit spermatozoa-zona pellucida binding. *J Cell Sci* 2007; 120: 33-44.
91. Levy NS, Vardi M, Blum S, Miller-Lotan R, Afimbinder Y, Cleary PA, Paterson AD, Bharaj B, Snell-Bergeon JK, Rewers MJ, Lache O, Levy AP. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of the human haptoglobin phenotype. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51: 1615-1622.
92. Shih AW, McFarlane A, Verhovsek M. Haptoglobin testing in hemolysis: measurement and interpretation. *Am J Hematol* 2014; 89: 443-447.
93. Vanuytsel T, Vermeire S, Cleynen I. The role of Haptoglobin and its related protein, Zonulin, in inflammatory bowel disease. *Tissue Barriers* 2013; 1: e27321.

94. Parmar T, Sachdeva G, Savardekar L, Katkam RR, Nimbkar-Joshi S, Gadkar-Sable S, Salvi V, Manjramkar DD, Meherji P, Puri CP. Protein repertoire of human uterine fluid during the mid-secretory phase of the menstrual cycle. *Hum Reprod* 2008; 23: 379-386.

APÉNDICE 1: Composición de medios y soluciones empleadas

Solución amortiguadora desnaturalizante:

Tris-HCl 0.6M pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol, β -mercaptoetanol 2%.

Buffer de rehidratación:

Urea 8M, CHAPS 2%, DTT 50 mM, Bio-Lyte 0.2%, azul de bromofenol.

Fluido tubárico humano (HTF):

KCl 4.69 mM, NaCl 97.8 mM, D-Glucosa 2.78 mM, CaCl_2 2.04 mM, MgSO_4 0.20 mM, KH_2PO_4 0.37 mM, lactato de sodio 21.4 mM, piruvato de sodio 0.33 mM, NaHCO_3 4.0 mM, HEPES 21.0 mM, gentamicina 10 $\mu\text{g/ml}$, Penicilina/Estreptomicina 0.25%. pH 7.3.